

**Aus dem Bereich klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**

**Thema: Untersuchung des Expressionsprofils und des Einflusses verschiedener  
Chemokine und ihrer Rezeptoren auf maligne und nicht-maligne humane  
Pankreaserkrankungen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der medizinischen Fakultät  
Der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2009**

**vorgelegt von: Henner Grimm  
geb. am: 21.01.1959 in: Tikrit/Irak**

**Thema: Untersuchung des Expressionsprofils und des Einflusses verschiedener Chemokine und ihrer Rezeptoren auf maligne und nicht-maligne humane Pankreaserkrankungen**

<b>Inhaltsverzeichnis:</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1. Ziele der Arbeit	6
2.2. Das Pankreas	6
Funktion des Pankreas	7
2.3. Die Pathophysiologie des Pankreas	8
Pankreatitis	8
2.4. Pankreastumoren	11
Das Pankreaskarzinom	12
2.5. Cytokine und Chemokine	21
2.5.1. Chemokinrezeptoren und deren Liganden (ausgewählte Paarungen)	25
2.5.2. Chemokine und ihre Funktion bei der Entstehung von malignen Erkrankungen und der Metastasierung	30
<b>3. Die Fragestellung dieser Arbeit</b>	<b>31</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
4.1. Material	32
4.1.1. Gewebepräparation	32
4.1.2. Auswahl des Patientenkollektivs	32
4.1.3. Puffer, Lösungen und Antikörper	35
4.1.4. Enzyme und Kits	38
4.1.5. Geräte	39
4.2. Methoden	39
4.2.1. Proteinisolation	39
4.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	39
4.2.3. Gesamt-RNA-Isolation	40

4.2.4. RNA-Konzentrationsbestimmung	41
4.2.5. cDNA-Synthese	44
4.2.6. PCR	45
4.2.7. Real-time PCR	46
4.2.8. ELISA	51
4.2.9. Gewebsschnitte	53
4.2.10. HE-Färbung	53
4.2.11. Immunhistochemie	53
4.2.12. Statistik	54
<b>5. Ergebnisse</b>	55
<b>6. Diskussion</b>	75
<b>7. Anhang</b>	82
7.1. Verzeichnis der Tabellen	82
7.2. Verzeichnis der Abbildungen	82
7.3. Literaturverzeichnis	84
<b>8. Danksagung</b>	91
<b>9. Lebenslauf</b>	92

## 1. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass bestimmte Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren bei der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung maligner humaner Pankreastumoren eine wichtige Rolle spielen, da sie unterschiedlich hoch in gesundem und krankem Gewebe von Patienten mit Pankreaskarzinom, Pankreasadenom und chronischer Pankreatitis exprimiert werden.

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch frühzeitige Metastasierung in Leber, Lunge und anderen Organen und infiltratives Wachstum in das Retroperitoneum entlang perineuraler Spalten, Lymph- und Blutbahnen sowie in benachbarte Organe bzw. Strukturen aus.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression proinflammatorischer und angiogenetischer CXC- und CC- Chemokine als mögliche Faktoren für das Entstehen, das Wachstum und die Ausbreitung von Pankreaskarzinomen untersucht.

Als Untersuchungsmaterial diente schockgefrorenes Gewebe von Operationspräparaten von 27 Patienten aus der Gewebebank des Labors der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg-Saar aus den Jahren 2002 bis 2005. Von diesen 27 Patienten litten 14 an einem Pankreaskarzinom, 6 an einem Pankreasadenom und 7 an einer chronischen Pankreatitis.

Als Nachweisverfahren wurden RNA-Isolation, Real time PCR, quantitative PCR, Gesamtproteinisolation, ELISA, Western Blot und Immunhistochemie angewendet, um das Expressionsprofil der verschiedenen Chemokin-Liganden und – Rezeptoren im jeweiligen pathologischen und benachbarten nichtpathologischen Gewebe zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Als Chemokine wurden die Liganden-Rezeptor-Paare CXCL12 und CXCR4, CCL20 und CCR6 sowie CCL19/CCL20 und CCR7 ausgewählt, da sie gemäß bereits vorliegender Studien mit der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung verschiedener anderer maligner Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Während meine Untersuchungen der CXCL12/CXCR4 und CCL19/CCL21/CCR7 Ligand/Rezeptorsysteme keine eindeutigen Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung dieser Systeme an der Entstehung oder der Progression des Pankreaskarzinoms zeigten, sah dies für das CCL20/CCR6 Ligand/Rezeptorsystem eindeutiger aus.

Meine Studien hierzu ergaben für den Chemokinliganden CCL20 und den korrespondierenden Rezeptor CCR6 eine signifikante Überexpression in Patienten mit

Pankreaskarzinom. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass CCL20 mit fortgeschrittenen T-Stadien assoziiert ist. Dies legt den Schluß nahe, dass CCL20 und CCR6 möglicherweise eine Rolle für die Entwicklung und die Progression des Pankreaskarzinoms spielen könnten. Eine Inhibierung des CCR6 Signalweges oder eine Neutralisierung von CCL20 Genprodukten durch Inhibition der CCL20 Proteinproduktion oder der Proteinaktivität, könnten nützliche Wege darstellen, eine weitere Progression der Krankheit zu verhindern und eine zukünftige Behandlungsstrategie im Management des Pankreaskarzinoms darstellen.

## **Abstract**

### **Investigation on the expression and influence of certain chemokines and their specific receptors on malignant and non-malignant human pancreatic diseases**

The results of my study on chemokines demonstrate that certain CXC- and CC- chemokines and their specific receptors have a potential contribution on the pathogenesis of malignant and non-malignant human pancreatic specimen, since they show a significant different expression in pathologic and non-pathologic tissues of patients suffering from pancreatic cancer, pancreatic adenoma or chronic pancreatitis.

Pancreatic cancer is characterized by early formation of metastases in liver, lung and certain other organs or structures, infiltration into the retroperitoneum, following perineural gaps, lymphatic and bloodvessels as well as into neighbouring organs and structures.

The present study is aimed at investigating the expression profile of proinflammatory and angiogenetic CXC- and CC-chemokines as potential factors contributing to the development, growth and spreading of pancreatic carcinomas.

The research material which forms the basis of this study consists of shock-frozen tissue of 27 patients (14 suffering from pancreatic carcinoma, 5 suffering from pancreatic adenoma and 7 from chronic pancreatitis), who had all been operated in the University Hospital Homburg – Saar in the period 2002 to 2005.

To assess and compare the different expression profiles within the different tissues, RNA-Isolation, Real time PCR, quantitative PCR, proteinisolation, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot and immunohistochemistry were used.

The chemokine ligand-receptor couples under investigation, namely CXCL12/CXCR4, CCL20/CCR6 and CCL19/CCL21 and CCR7 have previously been shown to be involved in the development, growth and formation of metastases in different other malignant tumors.

While expression studies on ligand-receptor couples CXCL12/CXCR4 and CCL19/CCL21/CCR7 did not show distinct results with regard to the development and progression of pancreatic carcinoma, expression results received for CCL20/CCR6 on mRNA and protein level looked distinct and promising.

The results of my investigations show that CCL20 and its corresponding receptor CCR6 are significantly up-regulated in patients with pancreatic cancer and that CCL20 is significantly associated with advanced T-category in those patients. This suggests that CCL20 and CCR6 play a role in the development and progression of pancreatic cancer. Thus, inhibition of CCR6 signalling or neutralization of CCL20 or inhibition of its production and activity may be useful in preventing further progression of the disease and may be a future basic treatment strategy in the management of pancreatic carcinoma.

## **2. Einleitung**

### **2.1.: Ziele der Arbeit**

Ziel meiner Untersuchung war es festzustellen, ob es in malignen Tumoren des Pankreas zu einer vermehrten Bildung sog. Chemokine bzw. ihrer Andockstellen den sog. Chemokinrezeptoren kommt, welche die Ausbreitung der Tumoren, insbesondere ihre Aussaat in Form sog. Fernmetastasen über die Blut- und Lymphbahn und durch Gefäßwände hindurch zu erklären hilft. Ist dies der Fall, so könnte dies einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie der malignen Pankreastumore ergeben, indem man gezielt ganz spezielle Chemokine oder deren Rezeptoren bekämpft, bzw. deren Rezeptoren mit anderen Liganden besetzt, so dass sie ihre Funktion einbüßen.

Ein neuer Ansatz in der Therapie der malignen Pankreastumore wäre aus verschiedenen Gründen sehr wichtig, da zum einen die bisherigen Therapieansätze noch bei weitem zu geringe Heilungschancen haben und zum anderen die chirurgische Therapie bei Diagnosestellung schon häufig nicht mehr indiziert ist, da der Tumor zu weit fortgeschritten ist. Dass die alleinige chirurgische Therapie heute nicht mehr der Goldstandard ist, zeigt sich auch an der Neuerung in der Empfehlung, dass jedwedes Tumorstadium immer auch chemotherapiert werden soll. Eine optimale Therapie wäre demnach bei einem früh diagnostizierten Pankreaskarzinom zunächst die chirurgische Resektion mit anschließender adjuvanter Chemotherapie. Beim fortgeschrittenen Karzinom die neoadjuvante Chemotherapie, anschließend die chirurgische Resektion und danach erneut eine adjuvante Chemotherapie.

Auf die verschiedenen Therapiemöglichkeiten wird in einem gesonderten Kapitel der Arbeit weiter unten noch eingegangen. Hier sollte die kurze Erwähnung nur dazu dienen, den Ansatz meiner Arbeit zu erläutern.

### **2.2.: Das Pankreas**

Das Pankreas (griech. pán = alles, kréas = Fleisch; Bauchspeicheldrüse) ist ein quer im Oberbauch liegendes Drüsenorgan des Menschen und der höheren Tiere. Es entwickelt sich in der Embryonalphase aus dem Epithel des Duodenum im Bereich des hepatopankreatischen Ringes der Duodenalanlage als dorsale und ventrale Pankreasanlage, welche gegen Ende des 2. Embryonalmonats miteinander verschmelzen.

Das Pankreas kann funktionell in einen exokrinen und einen endokrinen Teil, morphologisch in Caput -, Corpus -, Cauda pancreatis sowie Ductus pancreaticus major (Bauchspeicheldrüsengang/Hauptausführungsgang oder Wirsung-Gang) unterteilt werden.

Es hat eine durchschnittliche Größe von ca. 15 cm Länge, 3,5 cm Breite und 2,5 cm Dicke. Es wiegt ca. 80 g und liegt sekundär retroperitoneal S-förmig gekrümmt im Oberbauch der hinteren Bauchwand an.

Aus der o.g. Topographie des Pankreas ergeben sich folgende operative Zugänge:

- durch das Omentum minus
- durch das Lig. gastrocolicum entlang der Curvatura major des Magens
- vom Unterbauch her durch das Mesocolon transversum

## **Die Funktionen des Pankreas**

### **Die exokrine Funktion:**

Das Pankreas sezerniert Proenzyme also inaktive Vorstufen der Verdauungsenzyme. Diese Proenzyme gelangen in den gemeinsamen Ausführungsgang von Pankreas und Gallenblase und über die Papilla duodeni major in den Dünndarm, wo sie durch Enteropeptidasen aktiviert werden. Man unterscheidet vier verschiedene Enzyme des Pankreas:

- Trypsin, welches der Proteinspaltung dient
- Amylase und Maltase, welche der Spaltung von Kohlenhydraten dienen
- und Lipase, welche der Fettspaltung dient

Die durchschnittliche täglich vom Pankreas gebildete Menge an Pankreassaft beträgt 1.000 bis 2.000 ml.

### **Die endokrine Funktion:**

Die Langerhans-Inselzellen des Pankreas (nur etwa 1 – 2 % des Drüsengewebes) bilden die den Kohlenhydrathaushalt regulierenden Hormone Insulin und Glukagon sowie Somatostatin und pankreatisches Polypeptid. Sie verteilen sich über das gesamte Organ, sind aber im Schwanzbereich gehäuft aufzufinden. Die verschiedenen Zellen werden dem APUD (Amine- and-precursor-uptake-and-decarboxylation) -System zugeordnet.



## **2.3.: Pathophysiologie des Pankreas**

Neben den angeborenen Fehlbildungen des Pankreas wie der seltenen Pankreasagenesie oder –hypoplasie, Pankreaszysten, Pancreas divisum, Pancreas anulare und ektopem Pankreas wird zwischen entzündlichen Pankreaserkrankungen (chronischer und akuter Pankreatitis), Pankreasinsuffizienz und benignen wie malignen Tumoren des Pankreas unterschieden.

### **Pankreatitis**

#### **akute Pankreatitis**

Bei der akuten Pankreatitis handelt es sich um eine akute abdominelle Erkrankung, die mit z.T. erheblichen Schmerzen und Verdauungsstörungen einhergeht und morphologisch zu einem durch Ödem und Nekrose gekennzeichneten Bild führt. Je nach Schwere dieser Organveränderungen verhält sich der Krankheitsverlauf. Dabei schwankt die Letalität zwischen 2 und 50%. Ursächlich überwiegen mit ca. 80% Gallensteinleiden und Alkoholabusus. Weitere 10% sind auf iatrogene Manipulationen wie z.B. Oberbauchoperationen, ERCP oder Gallenwegeeingriffe (z.B. Papillotomie) zurückzuführen. Etwa 3% sind infektiös verursacht (z.B. Virusinfektionen), und ca. 7% haben seltenere Ursachen (Medikamente, Stoffwechselerkrankungen, Pankreastumoren, Anomalien, hereditäre Pankreatitiden).

Durch bestimmte Noxen (z.B. Alkohol), eine Gangobstruktion und dadurch bedingten Reflux kommt es zu einer Zellschädigung des Organs, welche zu einer Enzymaktivierung führt. Die Folgen sind: Autodigestion von Pankreas und extrapankreatischen Strukturen mit Kapillarschädigung und Albuminverlust sowie konsekutivem Volumenmangel, Fettgewebnekrosen, Freisetzung vasoaktiver Substanzen, Aktivierung der Blutgerinnung mit intravasaler Koagulation, die alle zusammen letztendlich zur Schocksymptomatik und respiratorischer und renaler Insuffizienz führen.

Die Therapie der akuten Pankreatitis richtet sich sehr nach Ursache, Verlaufsform und Schweregrad. Abgesehen von einer Cholezystektomie ggf. mit Revision des Ductus choledochus bei biliärer Ursache als Rezidivprophylaxe nach Abklingen des akuten Krankheitsbildes, ist eine chirurgische Sanierung meist nicht erforderlich. Anders bei der hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis. Hier ist immer eine Intensivtherapie angezeigt. Außerdem ist nur durch aggressives chirurgisches Vorgehen in Form von Nekrosektomie,

Lavage der Bauchhöhle, Drainage der Bursa omentalis und ggf. geplante Relaparatomie in festen Zeitabständen eine Sanierung zu erwarten (Bühling *et al.*,1995).

### **chronische Pankreatitis**

Dieser Erkrankung liegt eine chronisch-progrediente Entzündung mit Fibrosierung und Sklerosierung des Parenchyms zugrunde, was zu Schmerzen und zu Verlust sowohl der exokrinen wie langfristig auch der endokrinen Funktion des Organs führen kann. Man unterscheidet grob 5 Formen der chronischen Pankreatitis mit jeweils unterschiedlichen Ursachen:

- chronisch kalzifizierende Pankreatitis, gekennzeichnet durch Fibrose, Atrophie, Verkalkung des Parenchyms, irreguläre kurzstreckige Gangerweiterungen mit Eiweißablagerungen und Verkalkungen („small duct disease“), Zystenbildung; Ursachen: Alkoholabusus, Fettstoffwechselstörung, Medikamente, angeborene Anomalien
- chronisch obstruktive Pankreatitis mit Fibrose und Atrophie, selten Verkalkungen als Folge einer Stenose; Ursachen: Tumor, Folge eines Traumas, angeborene Ganganomalie, Gallensteinleiden
- chronisch sklerosierende Pankreatitis; Ursache: Autoimmunerkrankung
- hereditäre chronische Pankreatitis mit erhöhtem Karzinomrisiko; Ursache: autosomal dominant vererbte Mutationen des Trypsinogens führen zu gesteigerter Trypsinaktivität
- zystische Fibrose/Mukoviszidose: angeborene Fehlfunktion der Chloridkanäle führt zu Hyperviskosität des Sekrets

Pathophysiologisch kommt es neben der Produktion hyperviskosen Sekrets mit der Folge intraduktaler Ablagerungen und Steinbildung, zu primärer Zellschädigung, die zu einer intrazellulären Aktivierung der Pankreasenzyme führt mit den Folgen Nekrose, Fibrose, Verkalkung des Parenchyms.

Komplikationen vor allem als Spätfolge der Erkrankung sind:

- Verschlußikterus durch narbige Stenosierung des Pankreasparenchyms um den intrapankreatischen Abschnitt des Ductus choledochus
- Magenausgangsstenosen bei Einbeziehung des Duodenums
- Kolonstenosen
- Pankreaspseudozysten

- Milzvenenthrombose mit konsekutiver Hypertension und Fundusvarizen
- Pankreasabszeß
- Fistelungen zur Pleura, zum Perikard oder Peritoneum mit entsprechenden Flüssigkeitsansammlungen in Pleuraraum, Perikard oder Abdomen

Bei der Therapie der chronischen Pankreatitis muss man zwischen kausaler Therapie und symptomatischer Therapie sowie chirurgischer Therapie unterscheiden.

Operationsindikationen sind:

- Verdacht auf Vorliegen eines Pankreaskarzinoms
- therapieresistente Schmerzen
- Verschlußikterus bei Choledochusstenose
- Duodenalstenose
- pankreatogener Aszites oder Pleuraerguß
- Pankreaspseudozysten
- Fundusvarizenblutung bei Milzvenenthrombose

Die chirurgischen Maßnahmen haben vorwiegend symptomatischen Charakter, wobei sowohl pankreasresezierende, als auch nichtresezierende (organschonende) Verfahren zur Verfügung stehen. Obwohl das Ziel immer ein möglichst organerhaltendes Vorgehen sein sollte, muss die Entscheidung über das geeignete Verfahren von Fall zu Fall in Abhängigkeit von Symptomatik und Ausmaß der Parenchym- und Gangveränderungen („small duct disease“ vs. „big duct disease“) getroffen werden.

Ein organerhaltender Eingriff ist die laterolaterale Pankreatikojejunostomie zur Drainage.

Organresezierende Eingriffe sind die Pankreaslinksresektion mit Pankreatikojejunostomie bei überwiegender Lokalisation in Corpus und Cauda, die partielle Duodenopankreatektomie (Whipple-Operation), die pyloruserhaltende Resektion von Pankreaskopf und Duodenum (pp-Whipple) und bevorzugt die duodenumerhaltende Kopfresektion, die bei geringerem Risiko die günstigeren funktionellen Ergebnisse erbringt, sowie bei diffusem Befall die totale Duodenopankreatektomie ggf. mit dem Versuch der Autotransplantation der  $\beta$ -Zellen.

## **2.4. Pankreastumoren**

### **Einteilung/WHO-Klassifikation**

Die WHO-Klassifikation der epithelialen nichtendokrinen Pankreastumoren unterscheidet zwischen benignen Tumoren (Adenom/papilläres Adenom, Zystadenom) einerseits und malignen Tumoren (Adenokarzinom (mucinös/Siegelring-/adenosquamös), Plattenepithelkarzinom, Zystadenokarzinom, Azinuszellkarzinom, undifferenziertes Karzinom) andererseits; wobei benigne Tumoren des exokrinen Pankreas eher selten sind. Die meist serösen oder mucinösen Zystadenome oder Papillenadenome haben in ca. 20% die Tendenz maligne zu entarten. Sie sollten daher auf jeden Fall entfernt werden, seien sie nun symptomatisch oder asymptomatisch.

Bei den Malignomen des Pankreas unterscheidet man je nach Entstehungsort zwischen exokrinen, endokrinen und periampullären Tumoren, d.h. Tumoren der Papille, des intrapankreatischen Ductus choledochus und des Duodenums. Je nach Tumorentität weisen sie deutliche voneinander abweichende Formen des Verhaltens, der Symptomatik und der Prognose auf.

90% der exokrinen Tumoren gehen als duktale Adenokarzinome vom Gangepithel des Pankreas aus. Die übrigen Tumoren haben ihren Ursprung in den Azinuszellen, dem Bindegewebe oder sind histologisch nicht eindeutig klassifizierbar. Als sog. „nichtduktales Tumoren“ weisen sie ein breites Spektrum histologischer und prognostischer Unterschiede auf.

### **Das Pankreasadenom**

Das seröse Zystadenom hat seinen Ursprung in den dukталen Zellen. Morphologisch zeigen sich Zysten unterschiedlichen Ausmaßes in Corpus und Cauda. Je nach Art der Epithelauskleidung und Größe unterscheidet man zwischen dem häufiger auftretenden mucinösen bzw. makrozystischen Adenom und dem serösen bzw. mikrozystischen Adenom. Wobei ersteres eine höhere Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung hat (Zystadenokarzinom, duktales Pankreaskarzinom).

## Das Pankreaskarzinom

### Epidemiologie und Ätiologie

Bei der Mortalität durch Malignome nimmt das vom exokrinen Parenchym des Pankreas ausgehende Karzinom in Deutschland den 5. Platz (Jemal *et al.*, 2003) ein. Zwar hat sich die in den letzten Jahrzehnten beobachtete Zunahme des Pankreaskarzinoms etwas verlangsamt. Dennoch stellt das duktales Adenokarzinom des Pankreas weiterhin ein ungelöstes Problem der modernen Medizin dar. Die bevorzugte Altersgruppe sind Patienten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Jedoch sind Pankreaskarzinome auch bei jüngeren Patienten nicht ausgeschlossen (Boyle *et al.*, 2004). Männer sind insgesamt etwa 1,5 mal häufiger betroffen als Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei weit unter 5% (Brand, Tempero *et al.*, 1998) und von den 15 - 20% der Patienten, die operiert werden, überleben nur etwa 20% die kommenden 5 Jahre.

Die Kenntnis über die Risikofaktoren, welche zur Entstehung des Pankreaskarzinoms beitragen ist bislang noch begrenzt. Eine genetische Disposition ist wahrscheinlich (Schneider *et al.*, 2005). Hinweise sind das gehäufte Auftreten bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis und dem hereditären Kolonkarzinom (Lynch-II-Syndrom). Man schätzt, dass etwa 3% aller Pankreaskarzinome genetisch bedingt sind (Rosewicz *et al.*, 1997). Die molekularbiologische Grundlagenforschung der letzten Jahre hat ergeben, dass vor allem das übermäßige Auftreten von Wachstumsfaktoren und/oder deren Rezeptoren (Zytokine, Chemokine, Hypoxie, Zellzyklusregulatoren), neben Mutationen bestimmter Gene, die Zellvermehrung und Apoptose steuern (sog. Proto-/Onkogene; (Aktivierung von Onkogenen (K-RAS) bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TP53, CDKN2a, MAD4H))) für die Deregulation des Zellzyklus, die Apoptoseresistenz, die Angiogenese sowie die Invasion und Metastasierung, also für die Entstehung und Ausbreitung des Pankreaskarzinoms, ursächlich sind (Glazyrin, *et al.*, 2001). Erwiesen ist auch, dass diese nicht nur die Entstehung und Proliferation von Krebszellen gegenüber gesunden Zellen bevorteilen, sondern auch dass dadurch eine gewisse Resistenz gegenüber bisher bekannten und angewendeten Chemotherapeutika und Radiatio begründet ist.

Unter den exogenen Einflußfaktoren gilt ein erhöhtes Risiko bei Rauchern als gesichert. Weitere vermutete Risikofaktoren sind bestimmte z.T. beruflich bedingte Expositionen (Teer, Methylnitrosourethan, Kerosin u.a.) sowie nutritiv-toxische Faktoren, wie eine erhöhte Fettzufuhr und Alkoholabusus. Auch einem über längere Zeit bestehenden Diabetes mellitus

und längjährigen chronische Pankreatitiden wird ein erhöhtes Karzinomrisiko zugeschrieben (Keim *et al.*, 1997; Klosterhalfen *et al.*, 1992; Howes *et al.*, 2002).

## **Lokalisationen**

60 – 70% der duktaalen Adenokarzinome finden sich im Pankreaskopf. Die übrigen 30 – 40% verteilen sich zu nahezu gleichen Anteilen auf den Processus uncinatus, Corpus und Cauda (jeweils 10 – 15%). Letztere werden aufgrund ihrer meist fehlenden Symptomatik häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und weisen daher eine ungünstigere Prognose auf. Neben der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung in Leber, Lunge und andere Organe (Reihenfolge entsprechend der Häufigkeit), neigen Pankreaskarzinome zur frühzeitigen und ausgedehnten Infiltration des Retroperitoneums entlang der perineuralen Spalten, der Lymph- und Blutgefäße unter Einbeziehung der benachbarten Gefäße. Im fortgeschrittenen Stadium kann das Tumorwachstum auf benachbarte Strukturen wie Duodenum, Magen, Gallenwege (bei Pankreaskopfkarzinom) sowie Magen, Milz und Nebenniere bei lateral sitzenden Pankreaskarzinomen übergreifen.

## **Symptomatik**

Es gibt keinerlei typische Frühsymptome. Erst im fortgeschrittenen Tumorstadium kommt es bei 92% der Betroffenen zu Gewichtsverlust bedingt durch Malabsorption als Folge verminderter Enzymabgabe bei Pankreasstenose oder unzureichender Nahrungszufuhr aufgrund von Schmerzen, Übelkeit und allgemeinem Unwohlsein infolge einer Druckerhöhung im Pankreasgang.

Bei 82% findet sich ein schmerzloser Ikterus (DD: schmerzhafter Ikterus bei Gallensteinleiden mit Koliken). Dieser Ikterus kommt durch Kompression des Ductus choledochus durch Tumorgewebe oder Lymphknotenmetastasen, eventuell auch Lebermetastasen zustande. Der schmerzlose Ikterus (v.a. Sklerenikterus) ist das häufigste Symptom, welches die Betroffenen oder deren Angehörige dazu bringt einen Arzt aufzusuchen. Da die Gallenwege als Abfluss für das in der Leber konjugierte Bilirubin nicht mehr zur Verfügung stehen, wird es über die Nieren ausgeschieden und führt so zu einer Dunkelverfärbung des Urins und einer Entfärbung des Stuhls. Im weiteren Verlauf kommt es zur Einlagerung von Gallensalzen in der Haut mit der Folge eines Pruritus.

Die Schmerzen (72% aller Betroffenen) sind eher uncharakteristisch und abhängig von der Tumorausbreitung. Sie reichen von Oberbauchschmerzen bis hin zu Rückenschmerzen vor allem bei retroperitonealer Infiltration (Hinweis auf lokale Inoperabilität). Meist verspüren die Patienten eine Schmerzzunahme im Liegen und eine Abnahme im Sitzen.

Übelkeit mit Erbrechen, Thrombophlebitiden, aber auch psychische Veränderungen sind weitere Symptome des Pankreaskarzinoms. Bei Tumoren im Bereich der Cauda sind ebenfalls Schmerzen und Gewichtsverlust häufig. Ein Ikterus findet sich hier eher selten und wenn, dann erst in einem Spätstadium als Folge der Metastasen im Bereich der Leber oder von Lymphknotenmetastasen im Ligamentum hepatoduodenale.

## **Diagnostik**

Neben der Anamnese und der Klinik sind es vor allem Bildgebung und Labor, die einen eindeutigen Hinweis auf ein Tumorgeschehen im Bereich des Pankreas geben. Die präoperative Diagnostik dient vor allem dem Nachweis der Raumforderung, der Klärung der Resektabilität und der Frage nach einer möglichen Metastasierung. Die eindeutige Klärung der Frage, ob es sich um ein Malignom handelt ist erst durch eine Punktion (sehr schwierig aufgrund der Lage des Pankreas; s.o.), explorative Laparatomie und/oder Resektion möglich.

Klinisch findet sich neben dem oben genannten Ikterus häufig eine Hepatomegalie, in ca. 30% der Fälle eine palpable Gallenblase (positives Courvoisier-Zeichen: Kombination aus Ikterus und gestauter Gallenblase als Abgrenzung zu einem Ikterus bedingt durch Cholezystolithiasis mit nur geringgradiger Größenzunahme der Gallenblase und häufig typischer kolikartiger Schmerzsymptomatik; negatives Courvoisier-Zeichen). Hepatomegalie und Aszites sind Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums. Aufgrund von tumorbedingtem Milzvenen- oder Pfortaderverschluss kann es auch zu einer Splenomegalie kommen. Wichtig ist zudem eine Untersuchung auf Vergrößerung der Virchow-Drüse.

Der klinische Befund bei Tumoren im Bereich von Corpus und Cauda ist unspezifisch, teilweise finden sich Druckschmerzen im Oberbauch oder palpable Tumoren bei Größenprogredienz.

Blutchemische Untersuchungen dienen vor allem der Diagnose des Ikterus und der Differenzierung zwischen parenchymalen und cholestatischen Ursachen: deutliche Erhöhung von Serum-Bilirubin und alkalischer Phosphatase, weniger deutliche Erhöhung der Transaminasen als Hinweis auf ein Pankreaskarzinom. Auch die Serumwerte der Pankreasenzyme Pankreasamylase und Lipase können erhöht sein.

Daneben sollten auch die Tumormarker CA (karzinomassoziiertes Antigen) 19-9, CA 125 sowie CEA (karzinoembryonales Antigen) im Serum bestimmt werden. Zwar sind diese nicht pankreaskarzinomspezifisch, da auch bei anderen Malignomen oder benignen Pankreaserkrankungen erhöht (Jüngling *et al.*, 1997). Doch sie haben ihren Stellenwert bei der Beurteilung der Operationsradikalität und der Früherfassung eines Rezidivs in der Nachsorge. Die Bildgebung hat bei der Diagnostik des Pankreaskarzinoms einen entscheidenden Stellenwert. Zunächst kann durch eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens eine Abklärung des Ikterus erfolgen (Nachweis erweiterter extra- und intrahepatischer Gallengänge, Raumforderung). Der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom kann in bis zu 90% der Fälle rein sonographisch erhärtet werden. Ein Spiralcomputertomogramm (höhere Sensitivität und Spezifität) ermöglicht die Darstellung des gesamten Organs und mittels i.v. Kontrastmittelgabe, die der benachbarten Gefäße sowie größerer Lebermetastasen. Die höchste Sensitivität und Spezifität für das Pankreaskarzinom besitzt allerdings die ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie) mit über 90%. Das sog. „double duct sign“, d.h. eine gleichzeitige Erweiterung von Gallen- und Pankreasgang ist typisch für das Pankreaskarzinom. Darüber hinaus können eine Stenose oder der Verschluss des Pankreasganges oder die Darstellung einer Tumornekrose innerhalb des Pankreas als Hinweise dienen. Desweiteren kann bei dieser Untersuchung Pankreassekret zur zytologischen Untersuchung gewonnen werden. Zum Ausschluss eines Pankreaskarzinoms bei klinischem Verdacht, aber negativen Ergebnissen der Bildgebung sowie zur Entnahme von Gewebeproben bei Papillenkarzinom ist die ERCP unumgänglich. Neben der ERCP dient auch die PTC (percutane transhepatische Cholangiographie mit Drainage) der Darstellung intra- und extrahepatischer Gallenwege. Gerade bei hochsitzender Choledochusstenose und frustraner ERCP sowie zur präoperativen Gallenableitung bei hohen Serumbilirubinwerten kommt sie zur Anwendung. Weitere, aber eher seltene Bildgebungsverfahren sind die Zöliakomesenterikographie (angiographische Darstellung der Oberbauchgefäße), das MRT (Magnetresonanztomographie/Kernspintomographie) und die Endosonographie. Die Zöliakomesenterikographie ist nur notwendig, wenn die Gefäßverhältnisse nicht mittels CT abgeklärt werden konnten und dient insbesondere zur Sicherung der Nichtresezierbarkeit der Geschwulst. Das MRT erlaubt als einziges Verfahren Aussagen zu allen relevanten Strukturen (Parenchym, Pankreas- und Gallengang, Gefäße) und das Endosonogramm gibt Hinweis über genaue Lage und Infiltrationstiefe der Geschwulst.

Bei Patienten mit resektablem Tumor ist eine präoperative histologische Abklärung entbehrlich, da auch bei negativem zytologischem und histologischem Befund der



Tumorverdacht nicht ausgeschlossen werden kann, eine Zellverschleppung möglich ist und bei bestehendem Ikterus die Indikation zur Laparatomie ohnehin gegeben ist.

Nur bei nichtresektablem Befund sollte vor Einleitung der Palliativtherapie eine histologische und zytologische Klärung erfolgen.

## **Therapie**

### **Chirurgische Therapien**

#### **Pankreaskopfkarzinom**

Für Patienten mit Pankreaskarzinom bietet einzig die Tumoresektion eine Chance auf Heilung. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich allerdings nur ca. 20% der Tumoren in resektablem Zustand. Alle übrigen (80% aller Fälle) sind bei Diagnosestellung weiter fortgeschritten bzw. haben schon zu Absiedlungen in anderen Organen geführt. Bei diesen 80% steht die Frage nach geeigneten Palliativmaßnahmen zur Beseitigung des Ikterus, der Magenausgangstenose oder der Schmerzsymptomatik im Vordergrund. Dabei kommen sowohl operative als auch endoskopische und interventionell-radiologische Verfahren zur Anwendung.

Bei allen operationsfähigen Patienten mit lokal resektablem Tumor ohne Fernmetastasen ist die Indikation zur kurativen operativen Resektion gegeben. Präoperativ wird durch i.v. Gabe von Vitamin-K eine Gerinnungsstörung ausgeglichen. Bei gleichzeitiger Cholangitis oder Serum-Bilirubinwerten von  $> 20 \text{ mg/100 ml}$ , insbesondere bei Patienten in reduziertem AZ, empfiehlt sich eine Senkung des Bilirubins mittels ERCP mit Stent bzw. PTCD.

Die Operation nach Whipple-Kausch, d.h. die partielle Duodenopankreatektomie, bei der der distale Ductus choledochus, die Gallenblase, das Duodenum mit Pankreaskopf und die distale Magenhälfte einschließlich des regionären Lymphabflussgebietes und des Retroperitonealgewebes entfernt werden, war lange Zeit die operative Therapie der Wahl bei Karzinomen des Pankreaskopfes. Dabei erfolgt die Rekonstruktion mit dem proximalen Dünndarm, an den Restpankreas, Ductus choledochus und Restmagen angeschlossen werden. Die Pankreasresektion richtet sich in ihrer Ausdehnung nach der Tumorgöße und reicht in der Regel über die Höhe der V. mesenterica sup. nach links, wobei die Tumorfreiheit des Schnittrandes intraoperativ mittels Schnellschnitt histologisch überprüft wird. Heute kommt häufiger die modifizierte Operation nach Whipple-Kausch mit Erhalt des Pylorus (sog. pp-

Whipple-OP oder pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie) zur Anwendung, die bei gleicher Radikalität günstigere funktionelle Ergebnisse erzielt.

Wie sich die Lymphknotendisektion auf die Prognose auswirkt, ist bislang noch nicht zu 100% geklärt. Eventuell ist die Resektion des retroperitonealen Fett- und Bindegewebes prognostisch von noch größerer Bedeutung.

Eine Prognoseverbesserung durch Entfernung des gesamten Pankreas (totale Duodenopankreatektomie) mit dem Ziel einer noch größeren Radikalität und der Vermeidung einer Anastomoseninsuffizienz zwischen Restpankreas und Dünndarm konnte nicht erreicht werden.

Die Pankreaskarzinome mit Lokalisation in Corpus und Cauda sind wie weiter oben bereits erwähnt, bei Diagnosestellung meist weiter fortgeschritten und damit häufig irresektabel, so dass sich eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie unter Erhalt des Duodenums und eines Teils des Pankreaskopfes erübrigt.

Die Klinikmortalität der partiellen und totalen Duodenopankreatektomie bei duktalem Pankreaskarzinom liegt bei ca. 5%. Auch nach primär kurativer Resektion treten häufig Metastasen oder Lokalrezidive auf (Brokemeyer, Heidemann *et al.*, 1998: mittlere Überlebenszeit nach R0-Resektion: 12 – 18 Monate).

Nur Patienten mit eher kleineren Tumoren (< 2 cm) und ohne Lymphknotenmetastasen haben eine etwas höhere Heilungschance. Palliativ operierte Patienten versterben meist innerhalb der ersten 9 postoperativen Monate (Conlon *et al.*, 1996). Aufgrund dieser eher ernüchternden Prognose bei alleiniger chirurgischer Therapie und der immer noch häufigen Irresektabilität fortgeschrittener Pankreastumoren, gibt es verschiedene Ansätze adjuvanter und palliativer, nichtchirurgischer Therapien.

## **Chemotherapie**

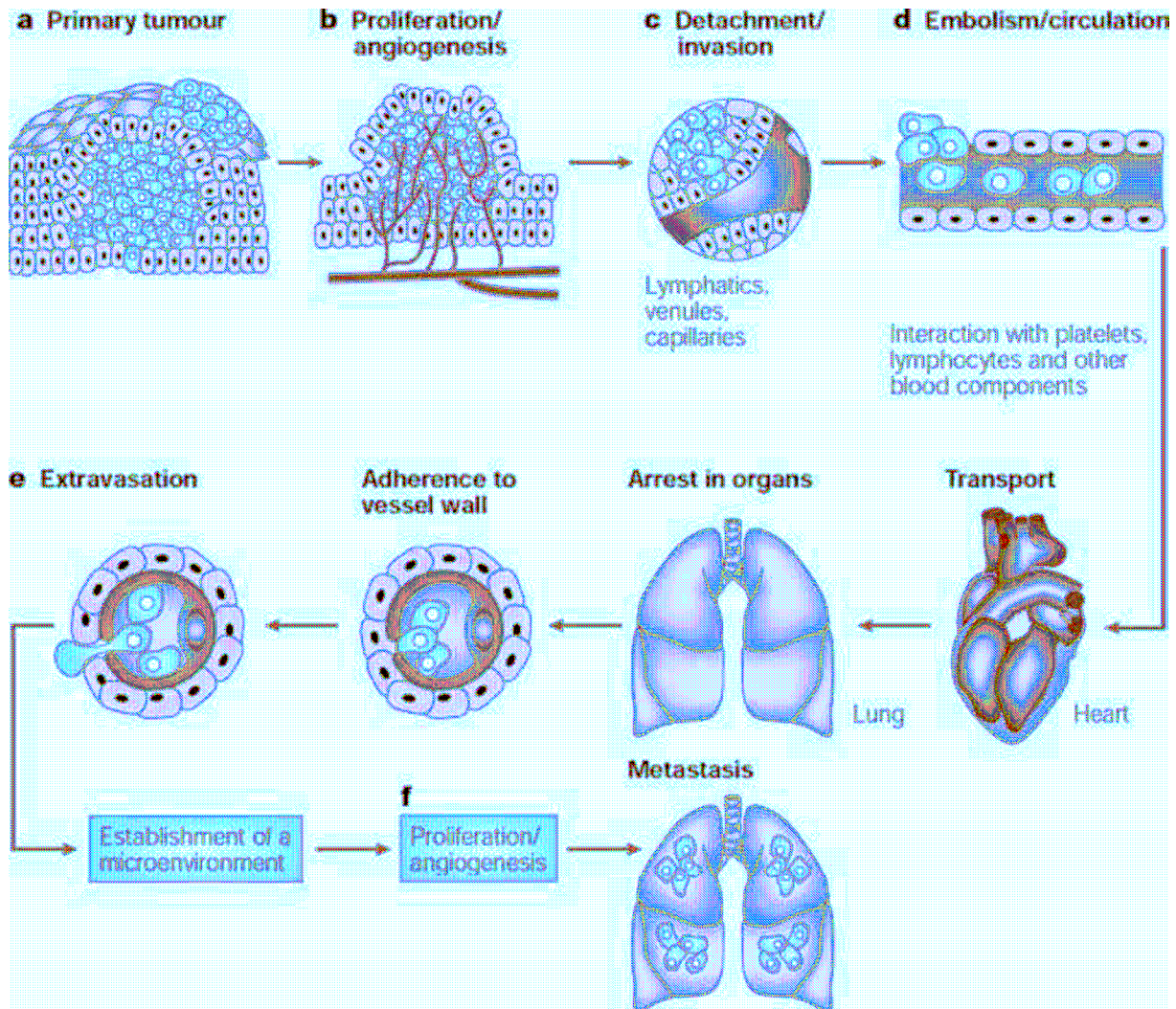
Die neoadjuvante Chemotherapie hat das Ziel ein lokal fortgeschrittenes und zunächst nichtresezierbares Pankreaskarzinom soweit zu verkleinern, dass es einer chirurgischen Therapie mit kurativem Ansatz zugeführt werden kann. Gleichzeitig muss während dieser Chemotherapie eine Aussaat von Tumorzellen in andere Organe verhindert werden. Bislang sind die Ergebnisse dieses Therapieansatzes unter Verwendung eines auf 5-Fluorouracil basierenden Schemas wenig erfolgversprechend. Weniger als 15% der behandelten Patienten konnten dadurch in einen operablen Zustand überführt werden (MD Anderson Cancer Center). Jedoch konnte durch den Einsatz präoperativer Radiatio in Kombination mit

Chemotherapie zumindest die Rate tumorinfiltrierter Resektionsränder gesenkt werden (Lillemoe *et al.*, 2000). Langzeitergebnisse mit Auswirkungen auf die Überlebenszeit bzw. Lebensqualität der Patienten nach der Therapie liegen allerdings noch nicht vor.

Für die adjuvante Therapie des Pankreaskarzinoms gibt es bislang sehr unterschiedliche Empfehlungen. So kommt im angloamerikanischen Raum eine Radio-Chemotherapie routinemäßig zum Einsatz, wogegen im mitteleuropäischen Raum der alleinigen Chemotherapie der Vorzug gegeben wird (Burris *et al.*, 1997), nachdem in vergleichenden Studien zwischen Radio-Chemotherapie und alleiniger Chemotherapie (EORTC, ESPAC-1) letzterer ein signifikanter Überlebensvorteil nach erfolgter chirurgischer Therapie zugeschrieben werden konnte (Arlt *et al.*, 2003). Eine für den Patienten sehr belastende Chemotherapie mit einer Kombination von 5-Fluorouracil, Cisplatin und Alpha-Interferon (Adsay *et al.*, 2001) konnte das 2- und 5-Jahres-Überleben nach radikaler chirurgischer Therapie sogar auf 64 bzw. 55% erhöhen.

Für die palliative Chemotherapie - ggf. nach operativer Gewährleistung der Magen-Darm-Passage bzw. des Galleabflusses - ist Gemcitabin das Chemotherapeutikum der Wahl (Tumorzentrum München, 2001: Remissionsrate 5 – 14%). Hierbei geht es vor allem um eine Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten durch eine Verzögerung der Tumorprogression und eine Linderung der Schmerzsymptomatik. Andere Substanzen oder Substanzkombinationen (5-Fluorouracil, Epirubicin, Cisplatin, sowie Radiochemotherapiekonzepte mit Gemcitabin als sog. Radiosensitizer) werden derzeit noch im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien geprüft (Berlin *et al.*, 2002).

Bei der Entwicklung geeigneter Chemotherapeutika geht es vor allem darum, die unphysiologische Proliferation der Tumorzellen einzudämmen, die Apoptoseresistenz dieser Zellen aufzuheben und den Prozessen der Angiogenese, der Invasion, der Metastasierung (Extravasation und Intravasation) Einhalt zu gebieten.



**Abb. 1:** Prozess der Invasion und Metastasierung (Schneider, 2005)

Da bei all diesen Fähigkeiten der Tumorzellen, sowohl genetische, als auch epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen, wird die Chemotherapie des Pankreaskarzinoms in Zukunft eine individuelle, multimodale Therapie sein und sich nicht auf nur ein einziges Chemotherapeutikum bzw. eine feste Kombination von Chemotherapeutika beschränken. Eine willkürliche Kombination verschiedener konventioneller Chemotherapeutika, wie bei anderen Tumorerkrankungen erfolgreich im Einsatz, kann beim Pankreaskarzinom nicht zu diesem Ziel führen. Vielmehr wird es notwendig sein, sehr individuell Chemotherapeutika und molekulare Therapeutika nach Testung ihres klinischen Ansprechens sowie ihrer Therapieresistenz durch molekulare Diagnostik vor Therapiebeginn zu kombinieren (Friess *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Gerade die Strategie des individuellen, kombinierten Einsatzes von Pharmaka, die gegen molekulare Zielstrukturen gerichtet sind (vgl. Therapie des HI-Virus, Therapie des Mammakarzinoms mit Herceptin) scheint hier zukunftsweisend zu sein (Garcea *et al.*, 2005).

So liegen zu dem Angiogeneseinhibitor TNP 470 bislang vielversprechende experimentelle Daten vor, da dieser in hoher Konzentration im Tiermodell angewandt, deutlich die Proliferation und Lebensfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen hemmen konnte und zu niedrigeren Metastasierungsraten führte (Folkman *et al.*, 2001).

Da das Onkogen HER2/neu im Pankreaskarzinom häufig überexprimiert wird, wird auch der Einsatz des Anti-HER2/neu-Antikörpers Herceptin erforscht (Glen *et al.*, 2006).

Ein neuer Therapieansatz ist auch die Tumorstimmung. Dabei wird versucht über eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort die Ausbreitung des Pankreaskarzinoms zu verhindern. Gerade die Tumorstimmung aus Primärkulturen des teilresezierten Pankreaskarzinoms (R2, nichtresezierbar) ohne Fernmetastasen mit palliativer Zielsetzung, zeigt vielversprechende Ergebnisse. Induziert durch eine hochgereinigte virusmodifizierte primäre Tumorzellvakzine aus nicht mehr teilungsfähigen Tumorzellen wird die zelluläre Immunantwort des Patienten aktiviert (Eckel *et al.*, 2006).

## **Radiatio**

Zum Nutzen der Strahlentherapie - ggf. in Kombination mit Chemotherapie – gibt es zur Zeit leider noch keine einheitlichen Ergebnisse. Die bisherigen Daten europäischer Studien sprechen eher dafür, dass eine Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom nicht wirksam ist, weshalb sie hier auch kaum mehr zum Einsatz kommt. Anders in einigen Tumor-Zentren der USA, wo die Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom meist in Kombination mit Chemotherapie und/oder auch nach chirurgischer Resektion nach wie vor angewendet wird.

## **Immuntherapie**

Ein noch relativ junger Therapieansatz ist die dendritische zellbasierte Immuntherapie, bei der dendritische Zellen zum Einsatz kommen, welche antigenspezifische Immunantworten initiieren bzw. regulieren. So können Immunantworten gegen bestimmte Tumorzellproteine generiert werden, so dass das körpereigene Immunsystem sich besser gegen die Malignomzellen zur Wehr setzen kann (Akiyama *et al.*, 2002). Die Wirksamkeit dieses Prinzips der Vakzinierung mit dendritischen Zellen wurde bereits durch mehrere klinische Studien bezüglich immunologischer, in Einzelfällen auch klinischer, Endpunkte belegt, bedarf aber noch intensiver Grundlagenforschung bis zur endgültigen Etablierung neben den bisherigen Therapieansätzen der operativen Therapie und der Chemotherapie (Eckel *et al.*, 2006).

## 2.5.: Cytokine und Chemokine

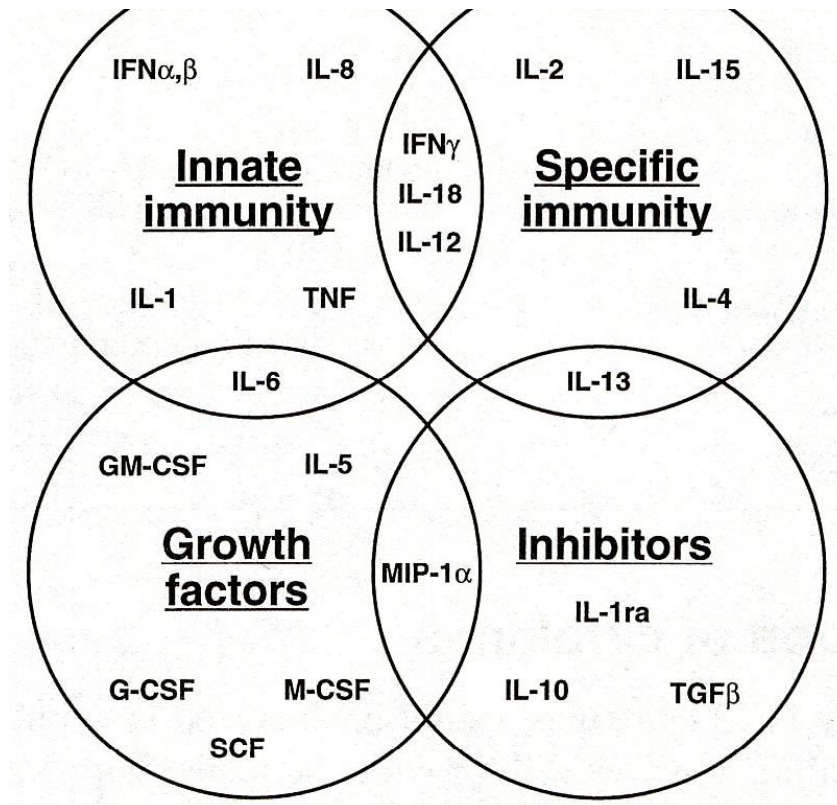
Wie aus den bisherigen Ausführungen hervorgeht, sind bestimmte zelleigene Stoffe – Cytokine oder Chemokine bzw. deren Rezeptoren – dafür verantwortlich, dass Tumorzellen in die Blut- bzw. Lymphbahnen gelangen und andernorts, d.h. in bestimmten Organen aus den Gefäßen austreten und dort zur Bildung von Absiedlungen (Tumor-Metastasen) führen.

Cytokine sind lösliche Proteine oder Glykoproteine, d.h. hormonähnliche regulatorische Moleküle, die von verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Organen gebildet und exprimiert werden und der Zell-zu-Zell-Kommunikation – also als Botenstoffe zwischen verschiedenen Zellen – dienen. Sie selbst sind keine Effektormoleküle, sondern dienen als Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren vor allem im hämatopoetischen System (Baggiolini *et al.*, 1997). Die Wirkung der Cytokine basiert auf dem Ligand-Rezeptor-Prinzip, wobei es sich bei dem Liganden nicht zwangsläufig ebenfalls um ein Cytokin handeln muss. Dieser kann genauso gut ein Hormon sein wie z.B. das in den Nieren produzierte Erythropoietin.

Die verschiedenen Cytokine lassen sich in unterschiedliche Strukturfamilien einteilen, innerhalb derer die Proteine homolog sind. So haben die Hämatopoietine beispielsweise alle ähnliche Intron/Extron-Grenzen in ihren Genen. Meist verwenden strukturell homologe Cytokine ein und denselben Rezeptor.

Cytokine dienen einer Vielzahl regulatorischer Funktionen wie z.B. der Kontrolle der zellulären und humoralen Immunantwort, der Entzündung, der Chemotaxis, der Tumorregression, der Apoptose, der Hämatopoese, der Entstehung von Fieber und der Akut-Phase-Reaktion.

Funktionell kann man Cytokine grob in vier verschiedene Klassen, deren Schnittmengen sich allerdings teilweise überlappen, einteilen. So dienen bestimmte Cytokine überwiegend dem angeborenen Immunsystem (innate immunity; z.B. Interleukin-1, Tumornekrosefaktor = TNF), andere überwiegend dem erworbenen Immunsystem (specific immunity; z.B. Interferon-alpha = IFN, Interleukin-4 = IL4), wieder andere als Wachstumsfaktoren im Bereich der Hämatopoese (Blutbildung; z.B. G-CSF, Interleukin-5) oder als Inhibitoren bei der Regulation der Immunantwort (z.B. Interleukin-10) (Duschl *et al.*, 2006).



**Abb. 2:** Cytokine – Einteilung nach Funktion

Bei den Cytokinrezeptoren handelt es sich meist um Dimere – z.T. mit einer dritten Untereinheit, um die Bindungsaffinität zu optimieren -, wobei die Rezeptordimerisierung intrazellulär eine Signaltransduktion auslöst. Eine Ausnahme bilden die Rezeptoren der Tumornekrosefaktoren. Sie sind Trimere, weil es sich bei den Tumornekrosefaktoren ebenfalls um Trimere handelt. Klinische Anwendung finden Cytokine z.B. in Form von Insulin beim Diabetes mellitus, Wachstumsfaktoren, Interferon bei der Therapie der Leukämie und Anti-CD3 bei Transplantatabstoßungsreaktionen (Korc *et al.*, 1998).

Die weitreichenden biologische Effekte der Cytokin-Aktivität werden unter normalen Bedingungen durch Immunzellen streng reguliert bzw. ausbalanciert. So werden Cytokine in der Regel nur dann von der Zelle produziert, wenn sie auch benötigt werden. Dann wirken sie entweder parakrin d.h. um die Aktivität der umgebenden Zellen zu beeinflussen oder autokrin, um die sie produzierenden Zellen zu modulieren (Rosenkilde *et al.*, 2004). Chemokine sind chemotaktische Cytokine und werden daher auch als Chemoattraktoren bezeichnet, weil die Effektorzellen (z.B. Granulozyten, Makrophagen) einem Konzentrationsgradienten bestimmter Chemokine folgend in das Gewebe einwandern (Ivarsson *et al.*, 1998). Sie sind kleine Polypeptide (zwischen 8 – 10 kD schwer), die von Phagozyten, Endothelzellen,

Keratinocyten der Haut, Fibroblasten und glatten Muskelzellen der Bindegewebe gebildet werden und wurden ursprünglich als Regulatoren der Immunreaktion und als Chemoattraktoren für hämatopoetische Zellen beschrieben. Eine weitere Funktion der Chemokine ist die Steuerung der Entwicklung und Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen. Heute rücken sie immer mehr in das Blickfeld der onkologischen Forschung, da sie gemeinsam mit ihren Rezeptoren die Angiogeneese, das Zellwachstum bzw. die Apoptose und die Metastasierung maligner Pankreastumore beeinflussen (Kleef *et al.*, 2008). Dabei haben sie sowohl inhibitorische (Apoptose) wie wachstumsfördernde (Angiogeneese, Metastasierung) Funktionen (Belperio *et al.*, 2002).

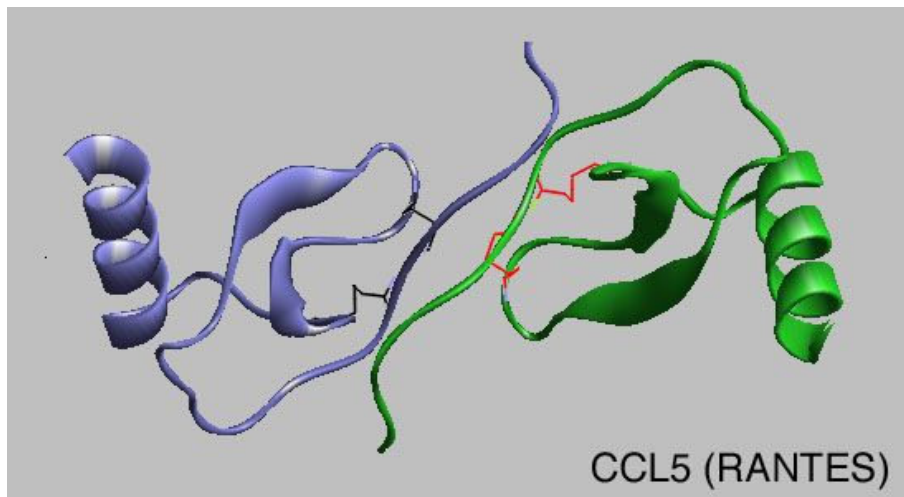
Da alle Chemokine strukturell untereinander homolog sind, trifft dies auch auf die Rezeptoren zu, bei denen es sich um G-Protein gekoppelte 7-Helix-Rezeptoren handelt. Da Chemokine ihre Rezeptoren häufig wechseln und verschiedene Chemokine ein und denselben Rezeptor benutzen (z.B. binden an CCR3 die Chemokine Rantes, Eotaxin 1 und 2, MCP 2, 3 und 4 sowie MIP-2-alpha), ist ihre Analyse relativ kompliziert. Grob kann man Chemokine in vier große Klassen einteilen, die CC-, CXC-, CX3C- und die C-Chemokine. Wobei sich die Bezeichnung C, CC bzw. CXC oder CX3C nach den zwei konservierten Cysteinen richtet, die bei CC-Chemokinen in der Sequenz direkt benachbart liegen, wogegen diese bei den CXC-Chemokinen noch durch eine Aminosäure, bei den CX3C-Chemokinen durch 3 andere Aminosäuren getrennt sind. Dagegen fehlt bei den C-Chemokinen der erste und dritte konservierte N-ständige Cysteinrest (Tanaka *et al.*, 2005).

CXC-Chemokine werden erneut in zwei Untergruppen unterteilt, in sog. ERL(+)- und ERL(-)-CXC-Chemokine, je nachdem, ob eine ELR (Glu-Leu-Arg)-Sequenz zwischen dem N-Terminus und dem konservierten Cystein vorhanden ist oder nicht. ERL(+)-CXC-Chemokine haben eine angiogene Wirkung auf Endothelzellen (Addison *et al.*, 2000), ERL(-)-CXC-Chemokine wirken dagegen meist angiostatisch (Ausnahmen: CXCL 12 u. CXCL2) und sind häufig durch IFN-gamma induzierbar (Wang *et al.*, 1998).

Entsprechend ihrer Struktur binden CC-Chemokinliganden an Rezeptoren mit der Bezeichnung CCR und CXC-Chemokine an Rezeptoren mit der Bezeichnung CXCR, CX3CL an CX3CR und CL an CR. D.h. die insgesamt 18 verschiedenen Chemokinrezeptoren, bei denen es sich um integrale Membranproteine mit sieben Transmembranhelices handelt, die an zu aktivierende G-Proteine gekoppelt sind (Schutyser *et al.*, 2003), können ebenfalls in vier Gruppen unterteilt werden. Auch in ihrer Wirkungsweise zeigen C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine gewisse Unterschiede. So wirken CC-Chemokine mit bestimmten Ausnahmen



hauptsächlich auf Makrophagen und T-Zellen, CXC-Chemokine dagegen vor allem auf Neutrophile Granulozyten. Bei der aktiven Form der Chemokine handelt es sich um unterschiedliche Homodimere (je nach CC- bzw. CXC-Chemokin), wobei sich die Strukturen der Monomere von CC- und CXC-Chemokinen aber wiederum sehr ähnlich sind.



**Abb.3:** Struktur des Chemokins CCL5

In der hier vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe verschiedener Nachweisverfahren (RNA-Isolation, Real-time PCR, quantitative PCR-Analyse, Gesamtproteinisolation, ELISA und Western Blot) das Expressionsprofil und der Einfluss verschiedener Chemokine und ihrer Rezeptoren auf humane Pankreastumoren untersucht werden. Als Chemokine wurden CXCL 12, CCL 20, CCL 19 und CCL 21 mit ihren entsprechenden Rezeptoren CXCR 4 (CXCL 12), CCR 6 (CCL 20) und CCR 7 (CCL 19 und 21) untersucht.

Als Untersuchungsmaterial diente schockgefrorenes Gewebe von Operationspräparaten von 27 Patienten aus der Gewebekbank des Labors der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes. Dabei wurde jeweils, sowohl pathologisches, als auch benachbartes gesundes Gewebe von 14 Patienten mit einem Pankreaskarzinom untersucht. Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls pathologische und nicht pathologische Gewebeproben von 13 Nicht-Tumor-Patienten, davon 6 Patienten mit einem Pankreasadenom und 7 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis.

### **2.5.1. Chemokinrezeptoren und ihre korrespondierenden Liganden (ausgewählte Paarungen)**

Im folgenden Abschnitt möchte ich die von mir in dieser Arbeit untersuchten 3 Chemokin-Rezeptor-Ligandenpaare genauer beschreiben.

Es handelt sich dabei um die Paare:

CCR6 <-> CCL20

CXCR4 <-> CXCL12 und

CCR7 <-> CCL19/CCL21.

In den ersten beiden Paarungen ist dem Chemokin-Liganden jeweils genau ein spezifischer Chemokin-Rezeptor zugeordnet, an welchen er bindet. Im Fall von CCL19 und CCL21 haben wir den Sonderfall, dass zwei unterschiedliche Chemokin-Liganden (CCL19 und CCL21) an den gleichen Chemokin-Rezeptor nämlich CCR7 binden, so dass es sich im Grunde genommen um insgesamt 4 Rezeptor-Liganden-Paarungen handelt.

#### **CCR6 <-> CCL20**

Das spezifische Rezeptor-Chemokin für den Chemokin-Liganden CCL20 ist CCR6. Im menschlichen Genom finden wir CCR6 auf dem Chromosom 6q27. Exprimiert wird er in lymphatischem wie nicht-lymphatischem Gewebe, vor allem in der Milz, den Lymphknoten, der Appendix, dem Pankreas. In geringen Mengen auch in Leukozyten des peripheren Blutes, dem Thymus, dem Dünndarm, der fetalen Leber und den Testes.

Der korrespondierende Chemokin-Ligand CCL20 befindet sich auf Chromosom 2q33-37 und ist als einziges Chemokin in der Lage an CCR6 zu binden und eine entsprechende biologische Antwort auszulösen. CCL20 ist auch bekannt unter den Namen: MIP3alpha, LARC, Exodus-1 (Kleef *et al.*, 1999).

Der Effekt der Bindung dieses Rezeptor-Liganden-Paares ist das Anlocken unreifer dendritischer Zellen sowie von Effektor- bzw. Gedächtnis-B- und T-Lymphozyten. Es ist damit für die Oberflächenbeschaffenheit von Haut und Schleimhaut unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen sowie bei pathologischen Prozessen (z.B. rheumatoide Arthritis, Karzinombildung und -wachstum) verantwortlich (Schutyser *et al.*, 2003). So wurde z.B. festgestellt, dass die Konzentration von CCL20 in mononuklearen Blutzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu der bei gesunden Patienten deutlich höher ist. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa konnte man zudem eine nochmals

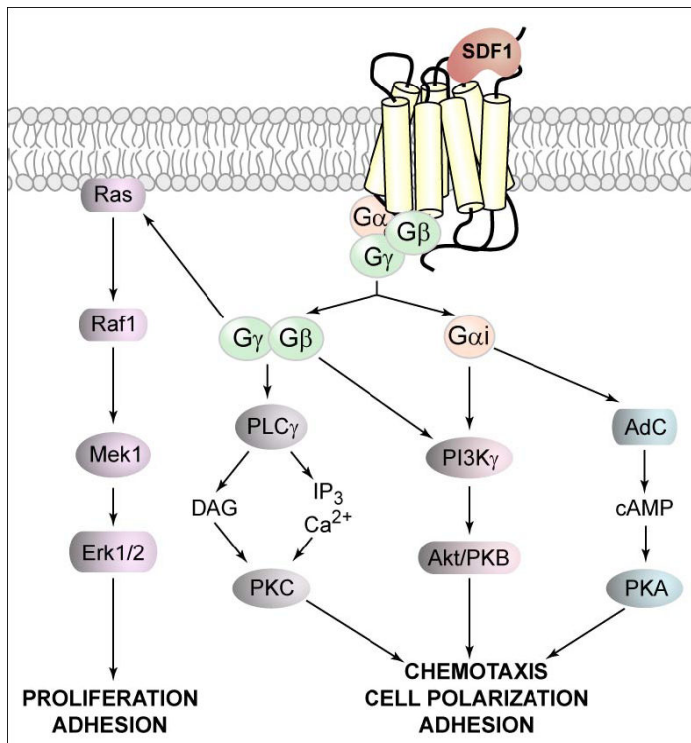
erhöhte Konzentration bei der Teilgruppe finden, die nicht mit anti-inflammatorischen Medikamenten therapiert wurde, im Vergleich zu der Teilgruppe, die eine solche Therapie erhielten. D.h. die Höhe der Expression von CCL20 in mononuklearen Blutzellen korreliert mit der Heftigkeit der Immun- bzw. inflammatorischen Aktivität des Patienten (Lee *et al.*, 2005).

## **CXCR4 <-> CXCL12**

Als nächstes Chemokin-Rezeptor-Liganden-Paar möchte ich die Paarung CXCR4 und CXCL12 vorstellen.

Bei dem Rezeptor CXCR4 handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auch bekannt unter den Bezeichnungen LD78, NPY-Rezeptor, LESTR oder Fusin (Herzog *et al.*, 1993). Der entsprechende Chemokin-Ligand ist CXCL12 oder auch SDF1 (stroma cell derived factor-1) genannt. Gebildet und sezerniert wird CXCL12 in Osteoblasten und Fibroblasten im Knochenmark, den Lymphknoten, den Muskeln und der Lunge sowie in Stromazellen von Leber und Niere und einigen Regionen des ZNS.

Sobald CXCL12 an CXCR4 bindet, löst es die Spaltung des  $G\alpha\beta\gamma$ -Proteins in einen  $G\beta\gamma$ -Komplex und eine  $G\alpha_i$  Untereinheit aus. Diese  $G\alpha_i$ - Untereinheit löst über die Aktivierung von Ras/MAPK, PI3K/Akt und PKC intrazellulär verschiedene biologische Aktivitäten wie Zellpolarisation, Chemotaxis, Zellproliferation, Zelladhäsion aus. Der verbliebene freie Komplex  $G\beta\gamma$  führt unterdessen über die Aktivierung von PLC zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG), wobei eine IP3-Erhöhung wiederum zur Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern führt, die für eine Polarisation wandernder Zellen notwendig ist.



**Abb. 4:** Signalkaskade des Chemokins CXCL12

Wie bereits weiter oben erwähnt spielt das Chemokin-Rezeptor-Liganden-Paar CXCR4 und CXCL12 eine wichtige Rolle bei infektiösen und inflammatorischen Prozessen des Körpers. So wird im Entzündungsbereich parenchymalen Gewebes die Expression von CXCL12 stark erhöht, so dass dieses von CXCR4 erkannt wird und dadurch die Migration von Lymphozyten in Richtung des entzündlichen Bereichs steuert (Gonzalo *et al.*, 2000/2003).

CXCR4 aktiviert Signale, welche die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen zur Folge haben. Diese wiederum sind notwendig um die transendotheliale Migration der Lymphozyten, also ihren Weg aus dem Blut ins Lymphsystem zu ermöglichen. D.h. CXCR4 ermöglicht erst eine gezielte immunologische Antwort des Körpers.

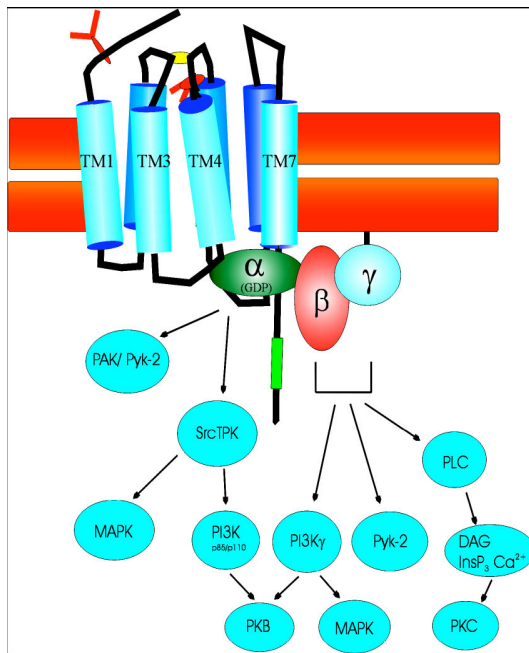
Daneben spielen CXCR4 und CXCL12 eine wichtige Rolle im kardiovaskulären und zentralnervösen System wie die genetische Analyse zeigt. So verstarben embryonale Mäuse in utero an diversen kardiovaskulären bzw. zentralnervösen Defekten, nachdem CXCR4 und CXCL12 bei ihnen zuvor ausgeschaltet worden waren (Tachibana *et al.*, 1998).

## CCR7 <-> CCL19 + CCL21

Der vor allem auf Leukozyten exprimierte Chemokinrezeptor CCR7 ist in seiner Expression abhängig vom Differenzierungsstadium und Aktivierungszustand der ihn exprimierenden migratorischen bzw. B- und T-Zellen.

So wird unter pathologischen Bedingungen CCR7 u. a. auf Tumorzellen wie Melanomen, Magenkarzinomen, Mammakarzinomen, Hodgkin-Lymphomen und Leukämiezellen (z.B. adulte T-Zell-Leukämie) stark vermehrt exprimiert (Nakata *et al.*, 2008). Diese Expression kann exogen noch durch verschiedene Faktoren wie die CD30L-Stimulation von Lymphomen oder die Stimulation von dendritischen Zellen mit CD40L, TNF, Prostaglandin (PG) E2 und LPS verstärkt werden.

Der Rezeptor CCR7 hat vor allem die Aufgabe, die gerichtete Migration von Zellen des Hämatopoetischen Systems in lymphatische Organe zu steuern und somit die adaptive Immunantwort zu koordinieren. So wandern auf Veranlassung von CCR7 diverse Leukozytenpopulationen über die Blut- und Lymphbahnen in die lymphatischen Organe ein. Im Lymphgewebe selbst werden T-Lymphozyten und dendritische Zellen über CCR7 in die T-Zell-Zone (periphere Lymphknoten u. Peyerplaques) oder in die periarterielle lymphatische Scheide (PALS) der Milz angelockt, um dort mit anderen Leukozyten zu interagieren (Breitfeld/Kim/Förster *et al.*, 1999 u. 2000).



**Abb. 5:** schematische Darstellung der Struktur von CCR7 und eine potentielle Signalkaskade

Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Aktivierung von Signalmolekülen nach ligandenabhängiger Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors CCR7. Nicht dargestellt sind die unterschiedlichen G-Protein-Untereinheiten und ihre Interaktion mit den aufgezeigten Signalwegen. Dargestellt sind die potentiellen Glykolysierungs- (Y-Zeichen) und Phosphorylierungsstellen (Balken) sowie die Disulfidbrücke (Kreuz) und das DRY-Motiv (Kreis) des CCR7-Proteins.

CCR7 kann mit gleicher Affinität an die Liganden CCL19 und CCL20 binden und dadurch in verschiedenen Zellen die Kinasen FAK, ERK, PKB, und JAK2 aktivieren (Adachi *et al.*, 2001). Unmittelbar nach der Stimulation von CCR7 durch Agonisten, werden neben den intrazellulären Molekülen auch sog. Adhäsionsrezeptoren (z.B. Integrine  $\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ) auf Lymphozyten aktiviert, die eine Anheftung an die Endothelmembran verursachen. Diese aktivierten Integrine binden wiederum an die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1/-2, VCAM-1, PNA und MadCAM (Pachynski *et al.*, 1998).

CCL19 und CCL20 werden konstitutiv in verschiedenen lymphoiden Geweben und der Lunge exprimiert. Im Gewebe werden diese homöostatischen Chemokine vor allem von dendritischen Zellen, Stromazellen und Endothelzellen sezerniert. CCL19 und CCL21 werden gleichermaßen auf den hochendothelialen Venolen (HEV) der Lymphknoten exponiert. Allerdings wird nur CCL21 von den HEVs selbst exprimiert, CCL19 wird durch

Transendozytose auf die basolaterale Oberfläche des Endothels transportiert. CCL21 konnte darüber hinaus auch auf afferenten Lymphkapillaren nachgewiesen werden.

In Vitro konnte außerdem die Expression von CCL19 durch LPS in dendritischen Zellen und in Neuronen durch Hypoxie induziert werden.

Durch CCL19 und CCL 21 wird die Migration nativer T-Zellen in die unterschiedlichen lymphatischen Organe gesteuert. Im Gewebe sind CCL19 und CCL21 bei der Auslösung einer Immunantwort in der T-Zell-Zone beteiligt. Sie stellen dort eine Verbindung zwischen T-Lymphozyten und dendritischen Zellen her (Förster *et al.*, 1999).

Im Genom des Menschen befinden sich CCL19 und CCL21 auf dem Genlokus 9p13 mit jeweils offenen Leserrastern von 297 Basenpaaren (CCL19) bzw. 402 Basenpaaren (CCL21) (Nagira *et al.*, 1997/1998).

Diese Sequenzen kodieren basische Polypeptide mit einer Länge von 98 (CCL19) bzw. 134 (CCL21) Aminosäuren. Im Gegensatz zu CCL19 besitzt CCL21 einen verlängerten basischen C-Terminus und kann damit vermehrt an Heparin (hochsulfatiertem Glykosaminoglykan) binden (Patel *et al.*, 2001).

Nach Bindung an den Rezeptor CCR7 auf unterschiedlichen Zellen aktivieren CCL19 und CCL21 mitogene Signalwege der Zellteilung, Integrine wie  $\alpha 4 \beta 7$ , die der Zelladhäsion dienen, und chemokin-induzierte Migration (Banas *et al.*, 2004).

### **2.5.2. Chemokine und ihre Funktion bei der Entstehung von malignen Erkrankungen und der Metastasierung**

Die oben beschriebenen Funktionen von Chemokinen bei der Steuerung der Immunantwort bei infektiösen und entzündlichen Prozessen sind schon seit längerem bekannt.

Darüber hinaus wird jedoch auch immer deutlicher, dass Chemokine ebenfalls an einer Vielzahl tumor-assoziierten Prozesse beteiligt sind, u.a. an Tumorzellwachstum, Angiogenese, Angiostase, lokaler Invasion und Metastasierung (Rubie *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2009; Ebrahimi *et al.*, 2004). Über die Disregulierung der Expression von Chemokin-Liganden und Chemokin-Rezeptoren in Tumorzellen beeinflussen Chemokine das Tumorzell-Wachstum, deren Proliferation, deren Überleben bzw. Absterben, deren Migration, Leukozyteninfiltration und die tumorassoziierte Angiogenese (Kollmar *et al.*, 2006, 2007). All diese Funktionen der Chemokine in der Tumorgenese und Ausbreitung bieten zahlreiche Angriffspunkte bei der Krebstherapie (Eibl *et al.*, 2003).

So kann man über eine gezielte Blockade von bestimmten Typen von Chemokin-Rezeptoren oder Chemokin-Liganden das Tumorwachstum direkt oder indirekt (über die Angiogenese) negativ beeinflussen (Ding *et al.*, 2000).

Einige Melanomzelllinien produzieren die Chemokin-Liganden CXCL1 und CXCL8/II-8 und deren gemeinsamen Chemokin-Rezeptor CXCR2. Durch künstliche Blockade eines dieser Chemokine kann das Zellwachstum deutlich gehemmt werden.

Im Gewebe von malignen Mammatumoren und deren Metastasen konnte eine im Vergleich zu anderen Chemokinen und im Vergleich zu gesundem Brustgewebe erhöhte Konzentration der Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CCR7 nachgewiesen werden.

Desweiteren fanden sich erhöhte Konzentrationen der Chemokin-Liganden dieser beiden Chemokine (CXCL12 und CXCL21) im Knochenmark, Lymphknoten und Lungengewebe, den häufigsten Metastasierungsorten des Mammakarzinoms.

Auch bei der Metastasierung des malignen Melanoms soll das Chemokin-Rezeptor-Liganden-Paar CCL21 und CCR7 eine chemotaktische Funktion ausüben (Müller *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 1997).

All diese Forschungsergebnisse geben einen deutlichen Hinweis auf die Bedeutung, welche Chemokine beim „homing“ maligner Zellen in spezifischen Organen haben.

### **3. Die Fragestellung dieser Arbeit**

Ziel meiner Arbeit war es herauszufinden, welche Bedeutung verschiedene Chemokine bei der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung maligner und nichtmaligner humaner Pankreastumoren haben.



## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Gewebepräparation**

Bei den ausgewählten Gewebeproben handelt es sich um Operationspräparate von insgesamt 30 Patienten, die im Zeitraum von 48 Monaten zwischen dem 02.01.2002 und dem 30.12.2005 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätskliniken Homburg-Saar wegen einer malignen oder nicht malignen Erkrankung des Pankreas operiert wurden. Dabei wurde im Einverständnis der Patienten während der Operation sowohl pathologisches als auch benachbartes nichtpathologisches Gewebe aus dem Operationresektat entnommen und unmittelbar nach Entnahme in Tissue Tek gelagert, bei – 80°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die gewonnenen Gewebeproben wurden durch HE-Färbungen und durch Begutachtung eines unabhängigen Pathologen auf das Vorhandensein von pathologischen Tumorzellen untersucht.

#### **4.1.2. Auswahl des Patientenkollektivs**

Für alle Untersuchungen von Gewebematerial der ausgewählten Patienten, lag sowohl deren schriftliche Einverständniserklärung, als auch die Zustimmung der örtlichen Ethikkommission vor.

Es wurde pathologisches und benachbartes nichtpathologisches Pankreasgewebe von 14 Patienten mit einem malignen Tumor des Pankreas (Pankreaskarzinom) sowie als Kontrollgruppe das pathologische und benachbarte nichtpathologische Pankreasgewebe von 13 Patienten mit nichtmalignen Pankreaserkrankungen, davon 6 mit einem Pankreasadenom und 7 mit einer chronisch rezidivierenden Pankreatitis untersucht.

Über Alter zum Zeitpunkt der Operation und Geschlecht der Patienten, TNM-Stadium der Pankreastumoren, Grading sowie Zeitpunkt der Operation geben Tabellen 1 bis 3 Auskunft:

**Tab. 1-3:** Patientenkollektiv

<b>I. Pankreas-CA</b>	<b>Alter bei OP</b>	<i>Geschlecht</i>	<b>TNM-Stadium</b>	<i>Grading</i>	<i>OP</i>	<i>ND</i>
1	73	M	T1,N0,M0	GII	pp-Whipple	
2	63	M	T3,N1,M1	GIII	pp-Whipple	Nikotin
3	61	W	T2,N1,M1	GII	pp-Whipple	Z.n. CTX
4	78	M	T3,N1,M0	GIII	pp-Whipple	Z.n. Prostata-CA
5	70	M	T3,N0,M0	GII-III	pp-Whipple	
6	42	M	T3-4,N1	GI-II	pp-Whipple	NET
7	49	M	T3,N1,M0	GIII	pp-Whipple	
8	74	W	T3,N1,Mx	GII	pp-Whipple	
9	61	W			pp-Whipple	
10	69	M	T3,N1,M0	GII	pp-Whipple	
11	57	W	T3,N0,M0	GII-III	Pankreaslinksresektion m. Splenektomie	
12	64	W	T3,N1,Mx	GIII	pp-Whipple	Z.n.met. Mamma-CA (OP u. Rad.)
13	71	W	T2,Nx,Mx	GII	pp-Whipple	
14	69	W	T3,N1,M0	GII-III	pp-Whipple	

<b>II. Pankreasadenom</b>	<b>Alter bei OP</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>OP</b>	<b>ND</b>
1	32	W	pp-Whipple	
2	70	M	pp-Whipple	
3	63	M	pp-Whipple	
4	53	W	Pankreaslinksresektion m. Splenektomie	Seröses Zystadenom Cauda panc.
5	78	W	pp-Whipple	
6	57	M	pp-Whipple	

<b>III. chronische Pankreatitis</b>	<b>Alter bei OP</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>OP</b>	<b>ND</b>
1	45	M	pp-Whipple	
2	70	M	pp-Whipple	
3	39	W	pp-Whipple	C2-Abusus
4	49	M	pp-Whipple	C2-Abusus
5	46	W	pp-Whipple	
6	76	W	pp-Whipple	
7	67	W	pp-Whipple	C2-Abusus

#### 4.1.3. Puffer, Lösungen und Antikörper

- HPLC-Wasser
- 1 x TaqMan RT Puffer (Applied Biosystems; Foster City, CA)
- 2,5 µM Random Primer (Applied Biosystems; Foster City, CA)
- 500 µM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) (Applied Biosystems; Foster City, CA)
- Assays on demand (Applied Biosystems; Foster City, CA)

**Tab. 4:** Assays on demand (Applied Biosystems; Foster City, CA)

Symbol	Name	Public ID
CXCL12	Chemokine ligand 12	NM_000609
	(stromal-cell-derived factor1)	
CCL19	Chemokine ligand 19	NM_006274
CCL20	Chemokine ligand 20	NM_004591
CCL21	Chemokine ligand 21	NM_002989
CXCR4	Chemokine receptor 4	NM_003467
CCR7	Chemokine receptor 7	NM_001838
CCR6	Chemokine receptor 6	NM_C0043675
PMM1	Phosphomannomutase I	NM_002676
CYCC	Cyclophilin C	NM_000943

- RIPA Lyse Puffer:

0,5 mM Tris HCl, pH 7,4  
 100% NP-40 Alternative  
 2,5% DOCA  
 1,5 mM NaCl  
 100 mM EDTA, pH 7,4  
 dd H2O

- 200 mM NaF
- 200 mM Na3VO4
- 25 x Stock Complete (Roche; Mannheim)
- 100 mM PMSF (Roche; Mannheim)
- 70% Alkohol
- Coating Puffer:

A: 1,24g Na2CO3 x H2O (1,03g Na2CO3) in 100ml A.dest.  
 B: 1,68g NaHCO3 in 200ml A.dest.  
 ➔ 30ml Lsg. A + 80-90ml Lsg. B (pH auf 9,6 einstellen)  
 ➔ bei 4°C lagern

- Absättigungspuffer:

12,1g Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan in 400ml  
 (mit 4N HCl den pH auf 7,5 einstellen)  
 5g BSA (Roche; Mannheim) dazu und auf 500ml mit A.dest. auf-  
 füllen und bei 4°C lagern

- TMB-Lösung:

120mg 3,3',5,5'-Teramethylbenzidin in 2,5ml Aceton lösen  
 + 22,5ml Ethanol abs.  
 + 150µl H2O2 30%  
 lichtgeschützt aufbewahren

**Tab.5:** Primärantikörper ELISA:

	Best.-Nr.	Firma	Arbeitskonzentration
CXCL12/SDF-1 alpha	#MAB350	R&D	2.500µg/ml
Monoclonal anti-human/mouse CXCL12 antibody			
CCL19	#Part 840285	R&D	144µg/ml
Goat anti-human MIP 3bets/CCL19 antibody			
CCL20	#MAB360	R&D	500µg/ml
Monoclonal anti-human CCL20 antibody			
CCL21	#XP-5128	ProSci	100µg/ml
Polyclonal anti-human CCL21 antibody			

- Sekundärantikörper Elisa:

**Tab. 6:** Sekundärantikörper ELISA

	<u>Best.-Nr.</u>	<u>Firma</u>	<u>Arbeitskonzentration</u>
CXCL12/SDF-1 alpha	#BAF310	R&D	50µg/ml
Polyclonal biotinylated anti-human SDF-1 alpha antibody			
CCL19	#Part840286	R&D	18µg/ml
Biotinylated goat anti-human MIP 3 beta/CCL19 antibody			
CCL20	#BAF360	R&D	50µg/ml
Polyclonal biotinylated anti-human CCL20 antibody			
CCL21	#XP-5128BT	ProSci	50µg/ml
Polyclonal biotinylated anti-human CCL21 antibody			

- Substrat-Puffer:

6,3g Zitronensäure-Monohydrat in 800ml A.dest.  
mit 4N KOH den pH auf 4,1 einstellen  
ad 1.000ml mit A.dest. (bei Kristallbildung frisch ansetzen)

- Abstopp-Lösung:

28ml H3SO4 (97%) + 500ml A.dest.

- Waschlösung:

(für einen Liter 0,01M PBS + 01% Tween 20 (Roth, Karlsruhe) pH 7,4)

0,01M Na2HPO4 x 2H2O: 1,7799g

0,01M NaH2PO4 x 2H2O: 1,5601g

0,15M NaCl: 8,7645g

pH mit NaOH auf 7,4 einstellen

1ml Tween 20 dazu

auf 1.000ml mit A.dest. auffüllen

- Primärantikörper ELISA:

- Standard ELISA:

Tab. 7: Standard ELISA:

	<u>Best.-Nr.</u>	<u>Firma</u>	<u>Arbeitskonzentration</u>
CXCL12/SDF-1alpha	hBA-68	Santa Cruz	50µg/ml
Recombinant human CXCL12			
CCL19	#Part840287	R&D	6µg/ml
Recombinant human MIP-3beta/CCL19			
CCL20	#360-MP	R&D	25µg/ml
Recombinant human CCL20			
CCL21	#PHC1475	Bio Source	100µg/ml
Recombinant human CCL21			

- Aqua dest.
- Mayers Hämatotoxin (Merck; Darmstadt)
- Stammlösung Eosin:  
1g Eosin (Merck; Darmstadt) in 50ml A.dest. + 50ml Alk. 96%
- Gebrauchslösung Eosin:  
Stammlösung 1:10 verdünnen + 3 Tropfen Essigsäure pro 100ml Färbelösung
- HCl
- Alkohol (70%, 80%, 90%, 96%, 98%)
- Xylol
- Eindeckmedium Entellan (Merck; Darmstadt)
- Aceton

#### 4.1.4. Enzyme und Kits

- Rneasy Mini Kit (Qiagen; Hilden)
- Rnase-free DNase (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- 1,25U/µl Multiscribe RT (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- TaqMan PCR Universal Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rocford, USA)

#### 4.1.5. Geräte

- Ultra Turrax (IKA-Werke; Staufen)
- Waage (Sartorius AG; Göttingen)
- Zentrifuge (Eppendorf; Wesseling)
- Photometer (Eppendorf; Wesseling)
- Gene AMP System 2700 (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (TaqMan) (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- Homogenisator (Bandelin electronic; Göttingen)
- Inkubator (Boekel-Grant; Feasterville, USA)
- Kryosthat

#### 4.2. Methoden

##### 4.2.1 Proteinisolation

In diesem Schritt der Analyse wurden jeweils zwischen 40 und 80mg Patientengewebe in 900µl Lyse-Puffer 5µl 200mM NaF (Phosphatase Inhibitor), 5µl 200mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Protein Tyrosin Phosphatase Inhibitor) 80µl 25X Stock Complete<sup>TM</sup> (Protease Inhibitor Cocktail) sowie 10µl 100mM PMSF (Protease Inhibitor) in einem Dispergiergerät homogenisiert. Letzteres wurde zu Beginn wie Ende der Analyse und jeweils zwischen den einzelnen Gewebeproben mit 70% Alkohol gründlich gespült, um Verunreinigungen der zu isolierenden Proteine aus den einzelnen individuellen Gewebeproben zu vermeiden. Nach der Homogenisierung wurden die Proben in einer Zentrifuge bei 4°C und 13.000rpm für genau 10 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abpipettiert und bei – 20°C eingefroren.

##### 4.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits von Pierce konnte anschließend die Konzentration der isolierten Proteine im Photometer bestimmt werden. Dies geschieht nach der von Bradford



entwickelten Methode. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Bindung von Coomassie brilliant blue G250 an Proteine von einer Wellenlänge von 465nm (ohne Protein) zu einer Wellenlänge von 595nm (mit Protein). Die jeweilige Zunahme der Absorption bei 595nm ist dann das Maß für die Proteinkonzentration der Probenlösung. Neben dieser relativen Konzentrationsbestimmung erfolgte noch eine absolute Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Proben mit Hilfe der Messung einer Verdünnungsreihe einer BSA-Standardlösung bekannter Konzentration. So erhält man durch Auftragen der Absorption bei 595nm gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe eine Eichgerade, aus welcher der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden kann.

Im Verhältnis 1 : 5 und 1 : 10 verdünnte Probenlösungen wurden als Doppelansatz mit 200µl Bio-Rad Farbstoff versetzt und anschließend bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Im ELISA-Reader konnte anschließend die Absorption des gebildeten Komplexes bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen werden. Daraufhin ließ sich die Proteinkonzentration der Probenlösung anhand der Standardkurve berechnen.

#### **4.2.3. Gesamt-RNA-Isolation**

Zur Isolation der Gesamt-RNA einer Gewebeprobe habe ich das sog. RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet.

Dieses verbindet die Geschwindigkeit der Microspin Technologie mit der selektiven Bindefähigkeit einer Silica-Gel Membran. Durch ein spezielles Salz-Puffer-System können bis zu 100µg RNA mit einer Basenlänge von über 200 Basen an die RNeasy Silica-Gel Membran gebunden werden. Dazu werden die Gewebeproben (Materialmenge jeweils 40- 60 mg) zunächst in einem hochdenaturierten Puffer, der Guanidin und Isothiocyanate enthält, lysiert und homogenisiert. Die RNase wird dabei inaktiviert, so dass die vollständige RNA isoliert werden kann. Zur Erlangung optimaler Bindungsverhältnisse erfolgt das Hinzufügen von Ethanol. Wird die Probe daraufhin auf die RNeasy Mini Säule gegeben, bindet die Gesamt-RNA an die Silica Membran. Verunreinigungen zum Beispiel durch Proteine können somit effektiv ausgewaschen werden. Den Herstellerangaben zufolge wurde anschließend die Isolation durchgeführt. Um eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, was wiederum zu falschen und somit unbrauchbaren Ergebnissen der Polymerase-Chain-reaction (PCR) führen könnte, wurden die Proben mit DNase inkubiert. Anschließend wird hochqualitative RNA in 50 µl HPLC Wasser gelöst.

#### 4.2.4. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren geschieht mittels des Photometrischen Verfahrens und beruht auf einer Extinktion der Stickstoff-Basen bei 260nm. Die Verunreinigung der Probe mit Polysacchariden oder Proteinen kann durch die Extinktionswerte bei 230 bzw. 280 nm ermittelt werden.

Optimale Ergebnisse der RNA-Präparation zeigen ein Verhältnis der Extinktionswerte von 260/230 nm bzw. 260/280 nm zwischen 1,7 bis 2,0. Die RNA-Konzentration lässt sich durch folgende Formel errechnen:

Formel zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$\text{Ext.260nm} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor} / 1.000 \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)}$$

Zur Messung der Extinktion wurde die RNA-haltige Lösung im Verhältnis 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt (1µl RNA-Lösung + 4µl H<sub>2</sub>O). Daraufhin erfolgte eine dreifache Messung mit Bildung des Mittelwertes.

Kurzprotokoll zur RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung:

#### RNA-Isolierung

##### Vorbereitung:

- Material immer für 4 Proben vorbereiten, da DNase für 4 Proben abgefüllt ist.
- RLT (Salze rauben Hydrathülle -> RNA kann an Säule binden)
- RW1 (wäscht Proteine und Zellbestandteile aus)
- RPE (mit 99,9% Ethanol ansetzen) (Niedrigsalzpuffer; Alkoholzusatz wichtig, da sonst die Hydrathülle entsteht)
- β-Mercaptoethanol (spaltet RNAsen)
- Ethanol 70% (99,9% Ethanol + HPLC im Verhältnis 7:3 mischen); (zerstört Hydrathülle -> bessere Bindung an Membran)
- D2H<sub>2</sub>O
- HPLC (salzfreie Elution)
- DEPC

- SDS
- Pipetten und Pipettenspitzen: 0,5 – 10 µl  
10 – 100 µl  
100 – 1.000 µl
- Turrax mit kleinem Aufsatz
- Zur Turrax-Reinigung: je 5 Glasröhrchen im Metall-Rack 1,5 cm befüllen mit  
1 \* SDS  
4 \* DEPC  
Glas mit D2H2O
- Eis
- NO
- Waage
- Schalen
- Pinzetten
- DNase auftauen (je Eppi 40µl)
- RDD-Puffer (280 µl zur 40 µl DNase geben => 320 µl => 4 \* 80 µl pro Probe)
- Je Probe 5 offene Eppis (20), 3 Eppis mit Deckel (12), 1 Filtereppi (4) beschriften und gemäß Skizze (s.u.) im Rack aufstellen.
- Photometer: mit D2H2O in Küvette -> blank
- Photometer: 320 nm = Küvettenverunreinigung  
280 nm = RNA und Proteine  
260 nm = vorwiegend RNA  
230 nm = Verunreinigung durch Lösung/aromatische Verbindungen  
Quotienten: 260/280 => 1,8 – 2,0 Reinheit der Präparation  
260/230 => > 1,8      dto.
- OP-Material: 40 – 50 mg

### **Procedure:**

1. Turrax reinigen
2. in Mixeppis ohne Deckel: je 600 µl RLT + 6 µl Mercaptoethanol
3. Probenmaterial holen (40 – 50 mg) in Mixeppi geben und mixen.
4. Materialmix in geschlossene Eppis umpipettieren

5. zentrifugieren (3 min bei 14.000 rpm)
6. Materialmix umpipettieren und je 600 µl Ethanol 70% zugeben;
7. mit Pipette mischen
8. 600 µl von Ethanol-Proben-Mix auf Filtersäule geben
9. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
10. Unterstand abschütten
11. Rest (600 µl je Probe) auf Säule geben
12. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
13. Säulen in frische Eppis stellen
14. je Säule 350 µl RW1-Puffer dazupipettieren
15. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
16. Unterstand abschütten
17. 80 µl DNase + RDD dazupipettieren
18. 15 min ruhen lassen
19. 350 µl RW1-Puffer dazugeben
20. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
21. Säulen in frische Eppis stellen
22. 500 µl RPE-Puffer dazugeben
23. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
24. erneut 500 µl RPE-Puffer dazugeben
25. zentrifugieren (20 sec bei 10.000 rpm)
26. 500 µl RPE-Puffer dazugeben
27. zentrifugieren (2 min bei 10.000 rpm)
28. Säulen in frische Eppis stellen
29. Trockenzentrifugation (1 min bei 14.000 rpm)
30. Säulen in frische Eppis stellen (mit Deckel)
31. je Probe 50 µl HPLC dazugeben
32. 1 min ruhen lassen
33. zentrifugieren (1 min bei 10.000 rpm)
34. Unterstand erneut auf Säule pipettieren
35. 1 min ruhen lassen
36. zentrifugieren (1 min bei 10.000 rpm)
37. Säulen entfernen
38. in 4 Test-Eppis mit Deckel je 50 µl D2H2O geben

39. je Probe nach kurzem Vortexen 2 µl auf 50 µl D2H2O geben
40. Vortexen
41. 52 µl Messprobe in Küvette geben
42. im Photometer messen
43. dilution – 2 – enter – 50 – enter – sample
44. ggf. Wiederholen mit anderer Verdünnung : z.B. 4 µl + 50 µl
45. Messergebnisse ausdrucken und archivieren
46. Eppis beschriften: Gewebe-Code (z.B. P.p.286)  
Inhalt (z.B. RNA+D)  
Datum, Initials
47. RNA-Proben bei –80°C lagern

#### 4.2.5. cDNA Synthesis

Mittels eines Enzyms der sog. Reversen Transkriptase (RT) kann RNA in Erststrang-copy-DNA (Erststrang-cDNA) umgeschrieben werden. Das Enzym RT besitzt diverse enzymatische Aktivitäten darunter u.a. RNA-abhängige DNA-Polymerase (RT) und Ribonuclease (RNase-H zum Abbau von RNA in RNA/DNA-Hybriden).

Durch Zugabe eines sog. Primers erhält man das bei der RT-PCR zum Start der DNA-Synthese nötige freie 3'Hydroxyl-Ende. Ein „Random Primer“ genanntes Hexanukleotid-Primer-Gemisch steuert das Umschreiben von RNA in Erststrang-cDNA. Der Random Primer ist ein Gemisch aus maximal 6 Basen kurzen Primern aller nur möglichen Sequenzkombinationen. Darüber hinaus braucht man noch Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine der DNA-Synthese und einen geeigneten Puffer.

Die Erststrang-cDNA dient in der nun folgenden PCR mit genspezifischen Primern als Schablone (sog. template).

Um eine durch Lagerung der isolierten RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bedingte Degeneration auszuschließen, wurden vor Durchführung der cDNA-Synthese alle Proben erneut photometrisch gemessen.

Danach wurden jeweils 5µg RNA einer Gewebeprobe mit 10µl 1x TaqMan RT Puffer, 10µl 2,5µM Random Primer, 4µl 500 µM dNTPs und 5µl 1,25 U/µl Multiscribe RT gemischt.

Man erhält so bei einem Endvolumen von 50µl eine einheitliche Konzentration von 100ng/µl. Zusätzlich erfolgte eine Mitpipettierung von RT Negativkontrollen, um eine DNA-Kontamination auszuschließen.

Anschließend erfolgte die PCR unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 10 Minuten bei 25°C
- 120 Minuten bei 37°C
- 30 Minuten bei 4°C

In einem Gene AMP System 2700 von Applied Biosystems wurde die cDNA-Synthese durchgeführt.

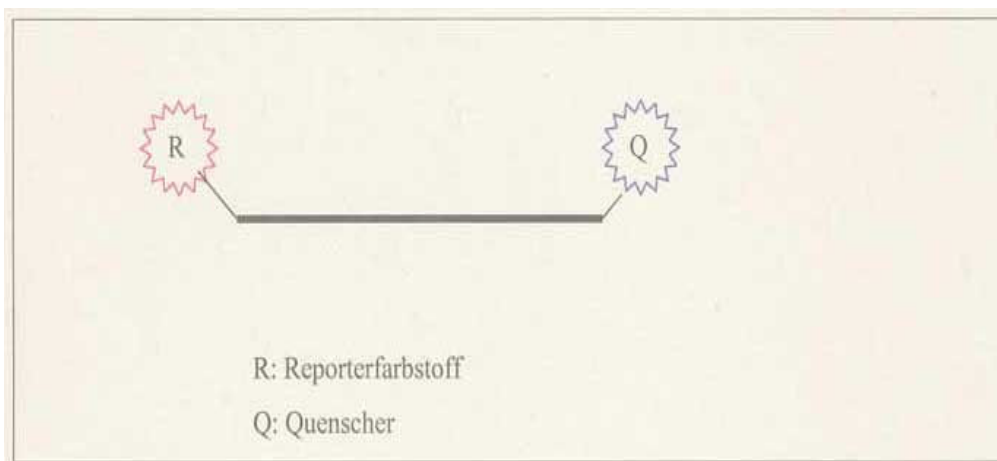
#### **4.2.6. PCR**

[http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/gentechnik/pcr\\_analyse.htm](http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/gentechnik/pcr_analyse.htm)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR; Polymerasekettenreaktion) dient dem labortechnischen Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten bekannter Sequenz im Erbmateriail. Die normalerweise als Doppelstrang vorliegende DNA wird dazu zunächst durch Erhitzen in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. Jeweils auf den Beginn und auf das Ende des spezifischen Abschnittes der so erhaltenen Einzelstränge werden Primer, d.h. Starthilfen mit komplementärem Muster der vorhandenen DNA gesetzt, wodurch diese an der speziellen Stelle binden können. Durch das Enzym Polymerase wird anschließend zu dem zwischen den Primern liegenden Einzelstrang-DNA-Intervall ein komplementäres Einzelstrang-DNA-Stück gebildet, indem die entsprechenden Basen sich ihrem Gegenüber anlagern. Nun erfolgt eine erneute Trennung des inzwischen gebildeten DNA-Doppelstranges durch Temperaturerhöhung. Die Bindungsstellen für die Primer werden somit wieder frei und mit Absinken der Temperatur kann das erneute Anlagern von komplementären Basen und damit die Bildung zweier DNA-Doppelstränge dieser speziellen Sequenz beginnen. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Vorganges der Temperaturerhöhung (Auftrennung der DNA-Doppelstränge) und Temperaturabsenkung (Anlagerung von komplementären Basen und damit Verdoppelung der Ausgangszahl an DNA-Doppelsträngen) erfolgt eine exponentielle Vervielfachung dieses speziellen DNA-Abschnittes in relativ kurzer Zeit. Durch diverse weitere Methoden können die so entstandenen DNA-Amplifikate sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

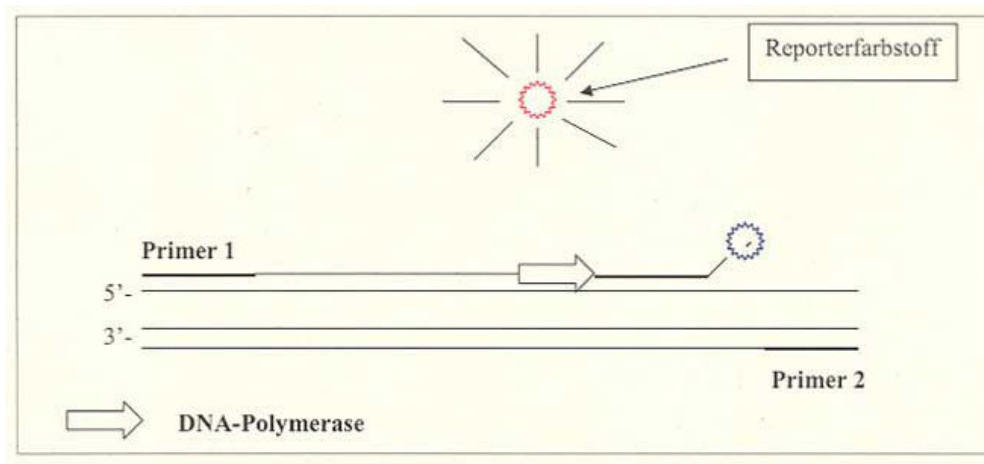
#### 4.2.7. Real-time PCR

Über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen erlaubt die Real-time PCR-Technologie eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR. Dazu wird dem PCR-Ansatz zusätzlich zu den spezifischen Primern eine sequenzspezifische Hybridisierungsprobe zugegeben, welche an ihrem 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert ist. Wird dann die intakte Sonde durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, so kommt es zur Unterdrückung der Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffes durch die räumliche Nähe zum Quencherfarbstoff, dem sog. Fluoreszenz-Energietransfer (FRET).



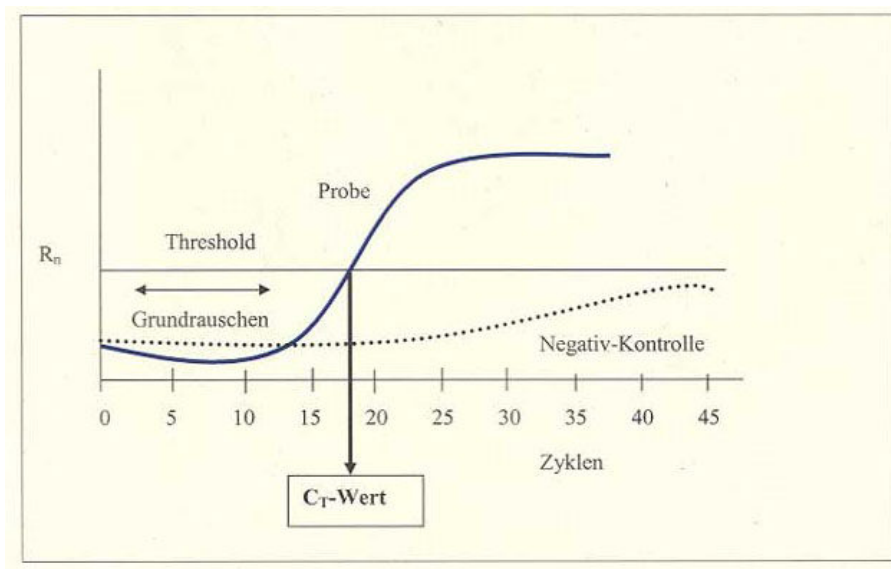
**Abb. 6:** markierte Hybridisierungsprobe

Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase wird die hybridisierte DNA-Sonde während der PCR zerteilt. Die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff wird dadurch unterbrochen, so dass der Reporterfarbstoff das Fluoreszenzlicht emittieren kann.



**Abb. 7:** Reporterfarbstoff emittiert Fluoreszenzlicht

Nur wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung der Sonde und Zielsequenz kommt, kann eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität erfolgen. Die Intensität des Fluoreszenzsignales steigt mit zunehmender Anzahl des spezifischen PCR-DNA-Fragmentes, wobei die Fluoreszenzzunahme direkt proportional dem Zuwachs an PCR-Amplifikat ist. Über den Threshold Cycle (CT-Wert), der die Anzahl der Zyklen zum Ausdruck bringt, bei dem zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über das Grundrauschen hinaus ermittelt wird, erfolgt nun die Auswertung.



**Abb. 8:** Ermittlung des CT-Wertes

Vorteile der Real-time PCR-Technologie sind die verringerte Kontaminationsgefahr, da das PCR-Amplifikat nicht mehr auf ein Agarosegel aufgetragen werden muss und es somit nicht



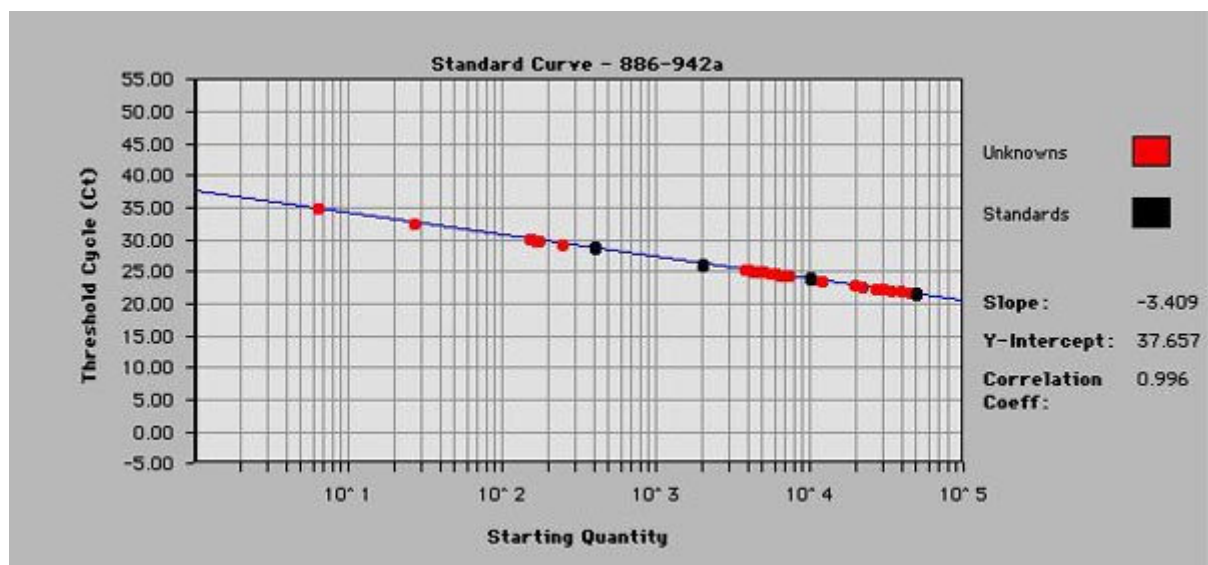
zu einem sog. „carry-over“ kommen kann und die Integration der Bestätigungsreaktion in den PCR-Lauf mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden.

Verschiedene Methoden zur Bestimmung der Regulation der Gen-Expression, der Identität und der Qualität verschiedener mRNA wurden getestet, mit dem Ergebnis, dass heute die gebräuchlichste Form zur Quantifizierung von individuellen genetischen Unterschieden in Tumor- gegenüber Nicht-Tumor Gewebe die fluoreszenzbasierte quantitative Real-time PCR (Q-RT-PCR) ist.

Dabei gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Quantifizierungsarten:

Erstens die absolute Quantifikation.

Dabei wird das PCR-Signal der Probe mit einer Standardkurve in Beziehung gesetzt.



**Abb.9:** Erstellen einer Standardkurve

Zweitens die relative Quantifikation. Hierbei wird das PCR-Signal der untersuchten Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Da verschiedene Personen in unterschiedlichen Krankheitsstadien miteinander verglichen werden sollen, sollte die Kontrollgruppe in allen Zelltypen stabil und unabhängig von den Versuchsbedingungen und Krankheiten exprimiert werden.

Die sog. Housekeeper-Gene, welche in allen kernhaltigen Zellen vorhanden sind und dem Überleben der Zellen dienende Informationen enthalten, erfüllen diese Voraussetzungen zumindest teilweise.

### Quantifizierung, Versuchsaufbau:

Alle Q-RT PCR Ansätze, die den Primer und den Probenmix enthielten, sog. „Assays on demand“ (AoD), wurden von Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) bezogen und entsprechend der Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Zielgen	CCL20	Applied Biosystems: Hs00171125
Zielgen	CCR6	Applied Biosystems: Hs00171121
Zielgen	CXCL12	Applied Biosystems: Hs00171022
Zielgen	CXCR4	Applied Biosystems: Hs00976734
Zielgen	CCL19	Applied Biosystems: Hs00171149
Zielgen	CCL21	Applied Biosystems: Hs00171076
Zielgen	CCR7	Applied Biosystems: Hs00171054
Haushaltsgen 1	PMM1	Applied Biosystems: Hs00963627
Haushaltsgen 2	CycC	Applied Biosystems: Hs00193177

Für die PCR-Reaktionen wurden je 10µl 2x Taqman PCR Universal Master Mix No AmpErase R UNG, 1µl Gen-assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), 8µl RNase-freies Wasser und 1µl cDNA Template (50mg/l) benutzt. Alle Reaktionen wurden doppelt ausgeführt und mit einem Kontrollansatz verglichen, der kein Template enthielt. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz hinzugefügt, welcher keine Reverse Transkriptase enthielt, um sicherzustellen, dass keine Verunreinigung mit genomischer DNA in den Proben besteht. Um die PCR durchzuführen wurde der ABI-Prism 7900 Sequence Detector wie folgt programmiert: 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen von jeweils 15s bei 95°C, und 10 min bei 60°C. Die Amplifikation der Zielgene wird durch Messung der Fluoreszenz-Signale gemessen. Die relative Quantifizierung der Zielgene wurde analysiert in bezug auf die Haushaltsgene Phosphomannomutase 1 (PMM1) und Cyclophilin C (CycC) und das Normalgewebe wurde als Kalibrator eingesetzt, so dass alle anderen Proben als ein n-Faches dieser Probe dargestellt wurden. Haushaltsgene wurden entsprechend einer Haushaltsgenstudie anhand von Vorarbeiten des Labors (Rubie *et al.*, 2005) ausgewählt. Ct-Werte wurden in die lineare Form konvertiert.

**Tab. 8:** Pipettierschema „relative Quantifizierung“

CDNA template	1µl
AoD	1µl
MM	10µl
HPLC-Wasser	8µl
Gesamt	20µl

b) absolute Quantifizierung; Pipettierschema: - Standardkurve:

**Tab. 9:** Pipettierschema „absolute Quantifizierung“

CDNA template	100ng	50ng	10ng	5ng	1ng
	2µl (undil. stock)	1µl (undil. stock)	2µl (1:10)	1µl (1:10)	2µl (1:100)
	µl	µl	µl	µl	µl
AoD	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
MM	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
HPLC-Wasser	9,25	10,25	9,25	10,25	9,25
Gesamt	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00

Standardkurve- und Probenansatz ebenfalls als Doppelansatz mit Bildung des MW.

a und b)

- die Proben wurden auf die 96-well Platten aufgetragen
- als Negativkontrolle wurde pro Platte eine Probe (zweifach) ohne cDNA template (NTC-Kontrolle) aufgetragen und eine „NoTranscriptase“ Kontrolle.
- die Detektion erfolgte im ABI-Prism 7900 Detektor unter den angegebenen Bedingungen: 10 Minuten bei 95°C

40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C

10 Minuten bei 60°C

#### 4.2.8. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Dieses immunologische Untersuchungsverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert, dient dem Nachweis verschiedenster biomolekularer Substanzen (Proteine, Viren) und niedermolekularer Verbindungen (Hormone, Toxine, Pestizide etc.) in einer Probe. Dies geschieht mit Hilfe spezieller spezifischer Antikörper, welche die Eigenschaft haben, an den jeweils nachzuweisenden Stoff, das sog. Antigen, zu binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem bestimmten Enzym markiert. In dem klassischen ELISA-Verfahren – auch als Sandwich-ELISA bekannt – kommen zwei Antikörper (AK) zum Einsatz, die jeweils beide hochspezifisch an das nachzuweisende Antigen (AG) binden. Wichtig ist dabei, dass die beiden AK an unterschiedlicher Stelle an das AG binden, weil sie sich sonst gegenseitig ihre Bindungsstellen belegen würden. AK1 (sog. coating AK) wird an eine feste Phase (am besten spezielle 96-Well Mikrotiterplatte) gebunden. Anschließend wird die Probe in die Wells pipettiert und das ganze für bestimmte Zeit inkubiert, so dass der AK1 genügend Zeit hat, an das spezielle AG der Probenlösung zu binden. Um ungebundene Bestandteile der Probe zu entfernen, die das Ergebnis verfälschen könnten, wird die Platte im Anschluss an diese Inkubationszeit gewaschen. Auf der Platte befinden sich nun nur noch AK1 mit dem daran gebundenen AG (Antigen-Antikörper-Komplex). Als nächstes werden mit Biotin markierte monoklonale Antikörper (AK2) auf die Platte gegeben und diese erneut inkubiert. So entsteht im zweiten Inkubationsschritt durch Bindung von AK2 an den AK1-AG-Komplex ein sog. Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Im nun folgenden dritten Inkubationsschritt wird das Biotin des AK2 durch ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gebunden. Das Substrat TBM (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) wird durch die Peroxidase oxidiert. Dies führt zu einer blauen Farbreaktion. Mit Hilfe von 0,25 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird die Farbreaktion nach einem bestimmten Zeitraum gestoppt. Anschließend wird die Konzentration des oxidierten TBM bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch bestimmt, wobei die Intensität der Farbreaktion proportional zur AG-Konzentration der Probe ist. Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration des AG in der Probe werden zusätzlich die Farbintensitäten mehrerer Standardproben mit schon bekannter Konzentration des AG bestimmt und daraus eine Standardkurve erstellt.

### **Versuchsaufbau:**

#### 1. Plattenvorbereitung/Coating:

- ELISA-Platte mit 50µl Primärantikörper (AK1) versehen  
(monoklonale Antikörper mit Coating-Puffer verdünnen; Konzentration: 2µg/ml)
- bei 4°C über Nacht inkubieren

#### 2. Absättigung der ELISA-Platten:

- Platte 3 x mit 0,01 M PBS + 0,01% Tween waschen
- 200µl Absättigungspuffer pro Well pipettieren
- bei 4°C über Nacht inkubieren

#### 3. Absättigungspuffer abkippen

##### Probenzugabe:

- Proben 1 : 5 in PBS/0,1 BSA verdünnen (50µl/Well)
- Doppelansätze pipettieren

#### Pipettieren der Standardkurve:

- Für Eichgerade 1µl rekombinantes Protein (0,5µg/ml) mit 249µl PBS/0,1% BSA mischen (Konzentration: 2ng/ml)
- 110µl PBS/0,1%BSA pro Well vorlegen und Verdünnungsreihe pipettieren

#### Zugabe des Sekundärantikörpers (AK2):

- biotinilierten AK2 mit PBS/0,1% BSA verdünnen (Konzentration: 0,1µg/ml)
- 50µl /Well pipettieren
- bei 4°C über Nacht inkubieren

#### 4. Konjugatzugabe:

- Platte 3 x mit PBS/0,1% Tween waschen
- Streptavidin-Pox verdünnen (1:1.000 mit PBS/0,1% BSA)
- 50µl/Well pipettieren
- bei Raumtemperatur (RT) 30 Minuten schütteln

#### 5. Substratzugabe:

- Platte 5 x mit PBS/0,1% Tween waschen

- 200µl Substratpuffer + TMB-Lösung (20:1) dazugeben
- Platte 15 Minuten abgedunkelt schütteln und entwickeln lassen

6. Stoppen der Farbreaktion:

- 100µl/Well Abstopplösung pipettieren

7. Photometrische Messung der Platte bei einer Wellenlänge von 450nm im ELISA-Reader

#### **4.2.9. Gewebeschnitte (Kryostatschnitte)**

Vor der Bearbeitung werden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebeblöcke auf  $-20^{\circ}\text{C}$  „erwärmt“. Auf einem „Schneideblock“ erfolgt dann das Auffrieren mit Tissue Teck. Die nun angefertigten  $4\mu\text{m}$  dünnen Schnitte werden anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Zur Fixierung werden diese für 20 Sekunden in Aceton ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) getaucht und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) an der Luft getrocknet. Danach erfolgt eine zweite Fixierung in Aceton diesmal allerdings bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Danach schließt sich eine zweite Trocknungsphase von 120 Minuten bei RT an. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgt bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.10. HE-Färbung**

Nach dem Auftauen werden die Gewebeschnitte mit A. dest. gespült und in Hämatoxylin für 8 Minuten gefärbt. Danach erfolgt eine erneute 2-malige Spülung mit A. dest. Anschließend werden die gewaschenen Gewebestücke für 30 Sekunden in eine 1% HCl/EtOH-Lösung getaucht. Es folgt eine 3-minütige Bläuungsphase unter Leitungswasser. Anschließend erneutes Spülen mit A. dest. Danach erfolgt das Eintauchen der Gewebestücke für jeweils 1 Minute in 70%, 80% und 90% Alkohol. Nach einer 3-minütigen Spülung im Xylol-Bad folgt die Eindeckelung mit Entellan.

#### **4.2.11. Immunhistochemie**

Das jeweilige Gewebe wird hierzu unmittelbar nach der Entnahme im Operationssaal in Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom werden aus den

Paraffinblöcken 4 bis 6  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger (Super Frost Plus) aufgezogen. Die Gewebeschnitte werden mit Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe bis hin zum entionisierten Wasser rehydriert. Danach werden die Gewebeschnitte mit „Antigen Retrieval Solution“ (Target Retrieval, Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA) behandelt. Nach kurzem Aufkochen in der Microwelle werden die Schnitte 10 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid inkubiert. Nach sequentieller Behandlung mit Avidin und Biotin (Avidin/Biotin Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) werden die Schnitte mit Kaninchenserum inkubiert. Einer Übernachtinkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper folgt eine Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper mit anschließender Detektion durch Immunfärbung in einer Avidin-Biotin-Peroxidase Reaktion (Vectastain ABC ELITE Kit, Vector Laboratories Inc.). Als Substrat wird eine Aminoethyl-Carbazid-Lösung verwendet; die Gegenfärbung erfolgt in einer Haematoxylin-Lösung (Merck, Darmstadt). Als Negativkontrollen werden grundsätzlich Schnitte ohne Antikörper mitgeführt. Gewebeschnitte werden als positiv gefärbt bewertet, wenn eine eindeutige Färbung in mehr als 20% der Zellen indentifiziert werden kann. Alle Präparate wurden zweifach von einem Pathologen ( Herrn PD Dr. M. Wagner, Pathologisches Institut der Universitätskliniken des Saarlandes) begutachtet. Die Anzahl der untersuchten IHC-Präparate entspricht der des o.g. und dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientenkollektivs.

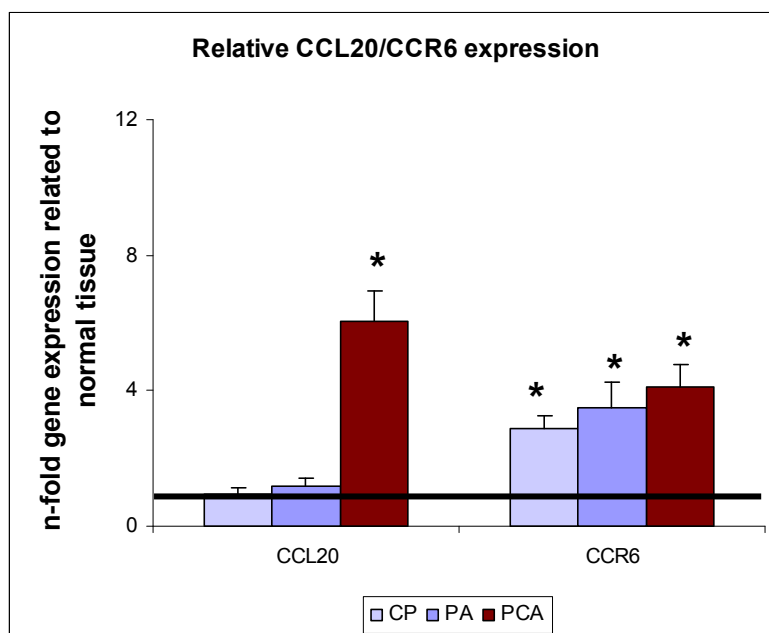
#### **4.2.12. Statistik**

Für die Expressionsanalyse der Chemokin-Liganden und Chemokin-Rezeptoren wurden Mittelwerte (MW) gebildet und der Standardfehler (s1) der Mittelwerte berechnet. Die gesamten statistischen Methoden wurden mit der MedCalc Software von Mariakerke (Belgien) durchgeführt. Entsprachen die Ergebnisse der Normalverteilung, wurde der parametrische t-Test verwandt. Da es sich bei meinen Proben um einen kleinen Probenumfang handelte, habe ich zur Prüfung auf Normalverteilung den Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Bei Abweichung von der Normalverteilung kam bei unverbundenen Stichproben der Wilcoxon-Rangsummentest und bei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest zur Anwendung. P-Werte die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant betrachtet.

## 5. Ergebnisse

Bei der Untersuchung der relativen Expression des Chemokinliganden CCL20 und seines korrespondierenden Chemokinrezeptors CCR6 auf der mRNA-Ebene im Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis, Pankreasadenom und Pankreaskarzinom zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben.

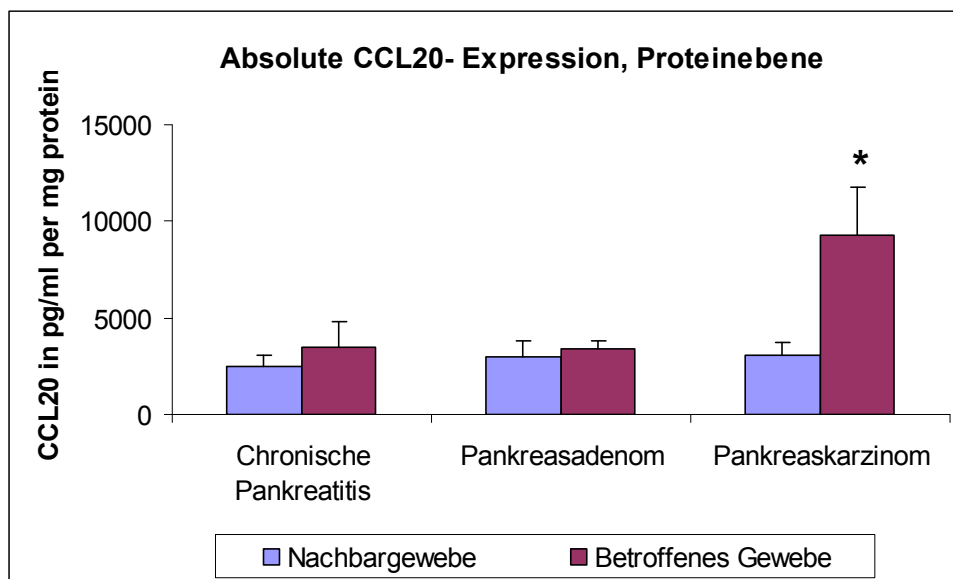
Sowohl CCL20 als auch CCR6 werden im Gewebe der Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant erhöht exprimiert, 6- bis 8-fach im Vergleich zum respektiven Tumornachbargewebe. Im betroffenen Gewebe der Patienten mit chronischer Pankreatitis und Pankreasadenom wird CCL20 nicht hochexprimiert im Vergleich zum jeweiligen befundfreien Nachbargewebe. CCR6 hingegen wird sowohl im betroffenen Gewebe der Patienten mit chronischer Pankreatitis, als auch in den Pankreasadenomen im Vergleich zum jeweiligen befundfreien Nachbargewebe signifikant hochexprimiert.



**Abb. 10: CCL20/CCR6 mRNA- Expression in Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP), Pankreasadenom (PA) und Pankreaskarzinom (PCA).** Q-RT-PCR Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben; n-facher Anstieg > 1 zeigt CCL20/CCR6 Überregulation im Vgl. zum Normalgewebe an; \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

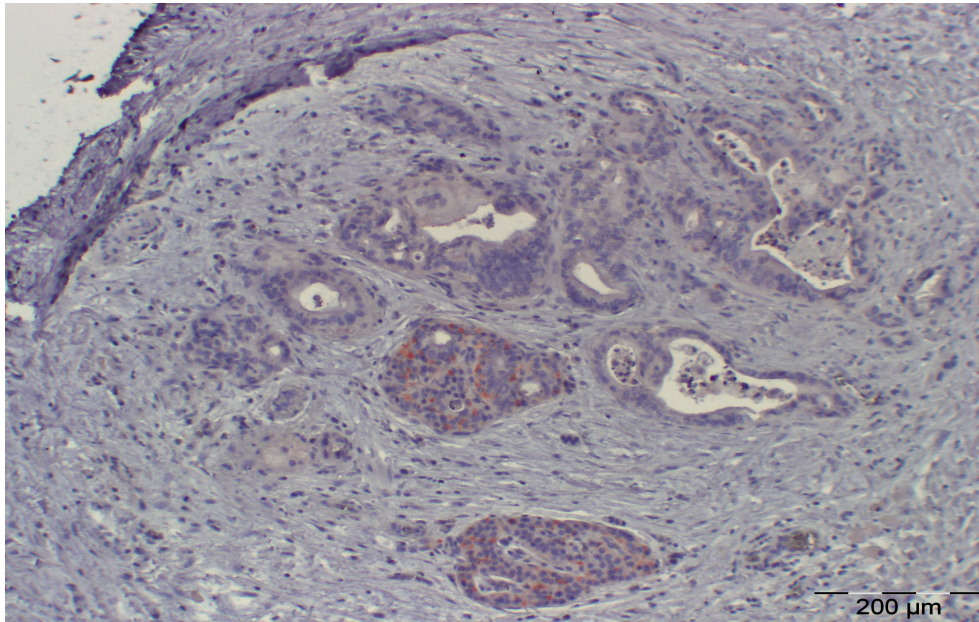


Auf Proteinebene zeigt sich bezüglich der Expression von CCL20 eine Parallele zur Expression auf m-RNA-Ebene. Auch hier ist die Expression im Tumorgewebe von Patienten mit Pankreaskarzinomen im Vergleich zum Nachbargewebe signifikant erhöht, ca. 9.000 pg/ml vs. 3.000 pg/ml. Klinisch-pathologische Untersuchungen zur Korrelation der CCL20 Expression mit klinischen Parametern haben ergeben, dass eine signifikante Korrelation zu fortgeschrittenen T-Stadien besteht. Dies könnte auf eine Rolle des CCL20 für die Progression des Pankreaskarzinoms hinweisen.



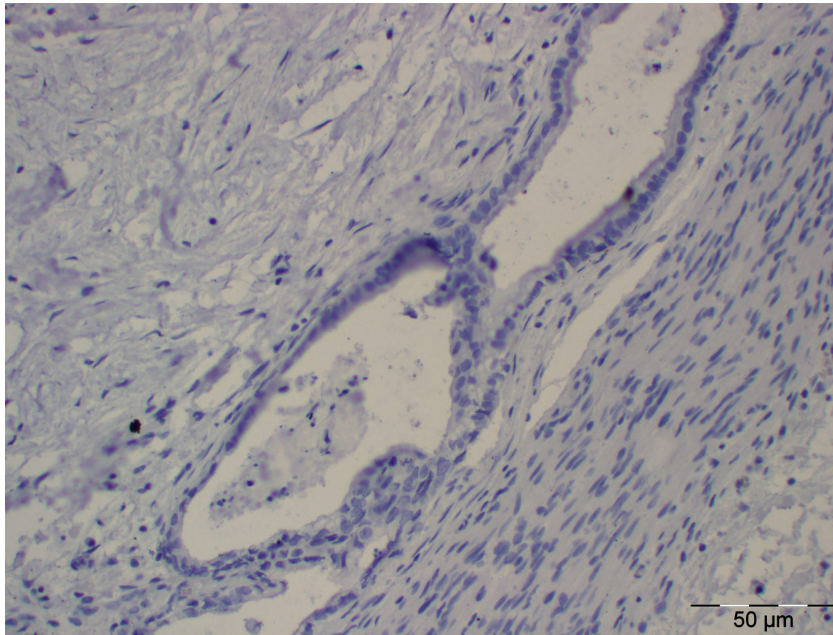
**Abb. 11: CCL20 Proteinexpression in Patienten mit chronischer Pankreatitis, Pankreasadenom und Pankreaskarzinom.** ELISA- Ergebnisse werden in pg/ml angegeben, \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

Für Pankreasadenom-Patienten und Patienten mit chronischer Pankreatitis hingegen zeigte sich für CCL20 kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen erkranktem und nicht betroffenem Gewebe. Diese Ergebnisse stimmen mit der RNA-Ebene überein.



**Abbildung 12:** Ductales Adenokarzinom (ICD-0-3) Code: 8500/3) des Pankreas mit desmoplastischer Stromareaktion. Miterfasst wurden Langerhans-Inseln, die eine zytoplasmatische Reagibilität mit Antikörpern gegen CCL20 aufweisen. Anti-CCL20 goat anti-human, 75µg/ml (MIP-3α; R&D Systems; Minneapolis, MN, USA). Avidin Biotin Komplex (ABC) Methode.

In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine CCL20 Expression vereinzelt in zytoplasmatischen, überwiegend aber in membranösen Signalen des Epithels sowohl in eingewanderten Makrophagen wie auch auf Langerhans-Inseln des endogenen Pankreas. Die Langerhans-Inseln bilden mehrere Hormone u.a. Insulin, Glukagon, pankreatisches Polypeptid und erfüllen wesentliche Aufgaben im Kohlenhydrat-, Fett- und auch Proteinstoffwechsel. Endokriner und exokriner Anteil sind funktionell und mit besonderen Gefäßanpassungen verbunden. Auch Karzinomzellen zeigten CCL20-Expressionssignale, allerdings in geringerer Häufigkeit. Häufig finden sich positive CCL20-Signale in unmittelbarer Umgebung der Invasionsfront des Tumors, wobei es sich hierbei allerdings um mesenchymale Zellelemente und nicht um Tumorzellen handelt.



**Abbildung 13:** Anteil einer Perineuralscheideninfiltration durch ein ductales Adenokarzinom (ICD-0-3) Code: 8500/3) des Pankreas, welches keine zytoplasmatische Reagibilität mit Antikörpern gegen CCR6 aufweist. Anti-CCR6 goat anti-human, Biomol C2099-70B 1:125 (CCR6; R&D Systems; Minneapolis, MN, USA). Avidin Biotin Komplex (ABC) Methode.

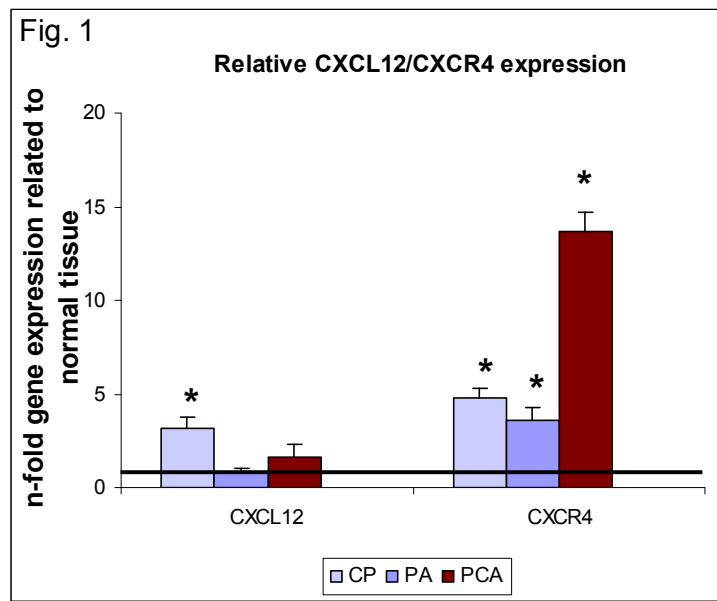
CCR6 zeigte in immunhistochemischen Untersuchungen einzelne feingranuläre zytoplasmatische Signale in Arealen mit mesenchymalen und azinären Zellen.

### **Expression des Chemokinliganden CXCL 12 und des korrespondierenden Rezeptors CXCR4**

Als nächste wurde das Chemokinliganden/Rezeptorenpaar CXCL12/CXCR4 bearbeitet. Die Untersuchung von CXCL12 zeigt eine 3-fache signifikant erhöhte mRNA-Expression für den Chemokinliganden CXCL12 im erkrankten Gewebe der Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu dem gesunden Gewebe derselben Patientengruppe. Für den korrespondierenden Chemokinrezeptor CXCR4 zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Expression im erkrankten Gewebe der Patienten mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu dem gesunden Gewebe derselben Patientengruppe.

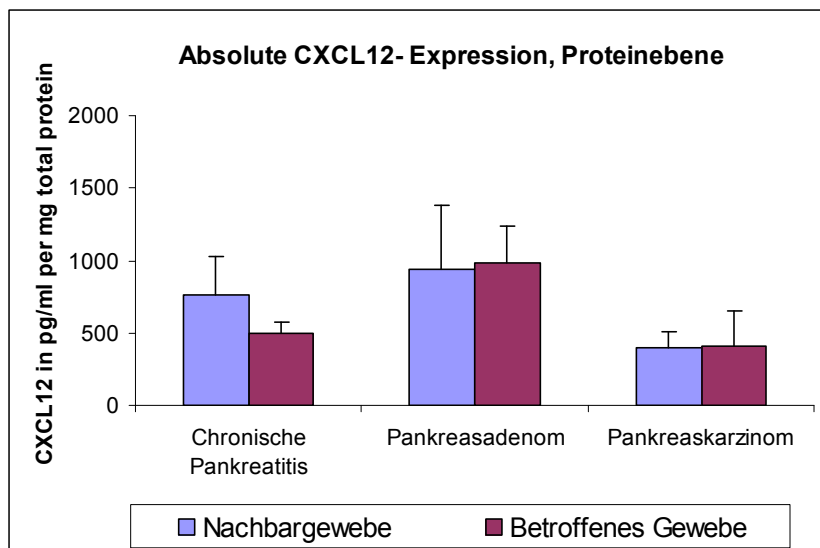
Für Pankreasadenom-Patienten ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen erkranktem und nicht betroffenem Gewebe für CXCL12. Für den Rezeptor CXCR4 hingegen zeigte sich auch hier eine signifikante Expressionserhöhung im erkranktem Gewebe gegenüber nicht betroffenem Gewebe.

Auch in der Untersuchung von Pankreaskarzinom-Patienten zeigten Ligand und Rezeptor ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während CXCL12 keine signifikant erhöhte Expression im Pankreaskarzinomgewebe aufwies, zeigte sein Rezeptor CXCR4 eine 14-fach erhöhte signifikante Überexpression im Pankreaskarzinom.



**Abb. 14: CXCL12/CXCR4 mRNA- Expression in Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP), Pankreasadenom (PA) und Pankreaskarzinom (PCA).** Q-RT-PCR Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben; n-facher Anstieg > 1 zeigt CXCL12/CXCR4 Überregulation im Vgl. zum Normalgewebe, \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mRNA-Expression zeigt sich auch auf der Proteinebene deutlich, dass es keinen signifikanten Expressionsunterschied in der Expression des Chemokinliganden CXCL12 zwischen betroffenem und nicht betroffenem Gewebe der Pankreasadenome und der Pankreaskarzinome gibt.

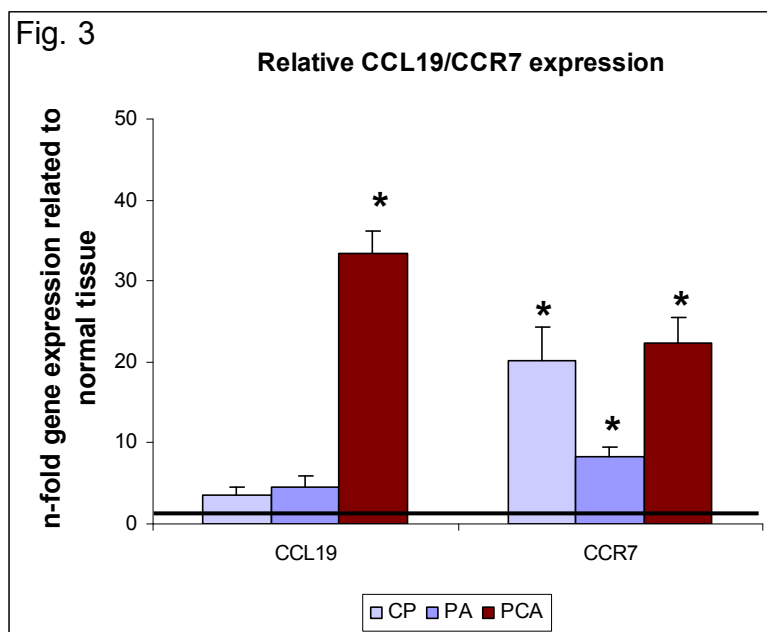


**Abb. 15: CXCL12 Proteinexpression in Patienten mit chronischer Pankreatitis, Pankreasadenom und Pankreaskarzinom.** ELISA- Ergebnisse werden in pg/ml angegeben, \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

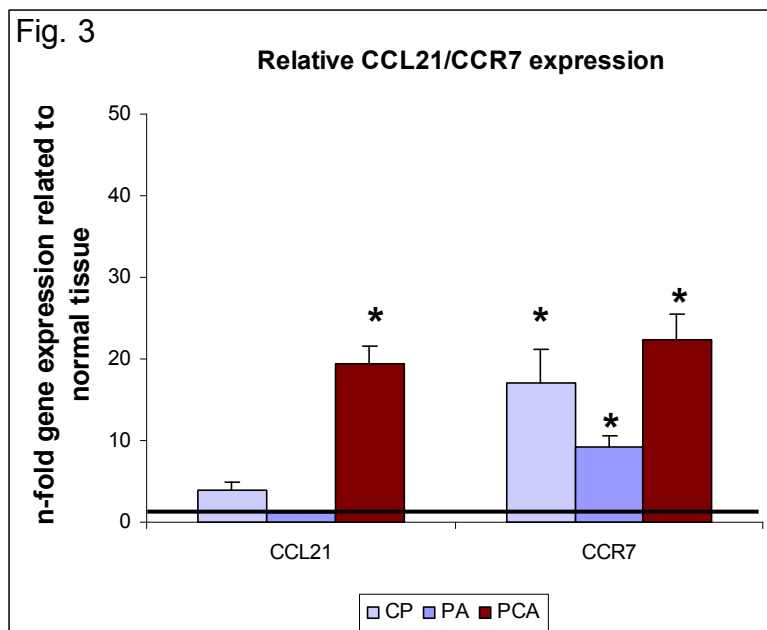
In den Geweben der Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigte das Pankreatitisgewebe eine signifikante Expressionserhöhung auf der mRNA-Ebene. Auf der Proteinebene hingegen zeigte sich eine leicht niedrigere CXCL12 – Expression im Vergleich zum nicht betroffenen Nachbargewebe. Allerdings ist dieser Expressionsunterschied aufgrund der respektiven Standardabweichungen nicht signifikant. Somit decken sich die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen der mRNA- und Proteinebene für CXCL12 in den beiden Entitäten Pankreasadenom und Pankreaskarzinom, während sich für die chronische Pankreatitis auf der mRNA- und Proteinebene unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Dies ist aber durch posttranskriptionelle und posttranslationale Modifikationen erklärbar.

## Expression der Chemokinliganden CCL19/CCL21 und ihres korrespondierenden Rezeptors CCR7

Die mRNA Expressionsergebnisse der Chemokinliganden CCL19 und CCL21 und des korrespondierenden Rezeptors CCR7 zeigen, dass die Expression der beiden Chemokine und ihres Rezeptors im Gewebe der Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant erhöht ist im Vergleich zum gesunden Nachbargewebe derselben Patienten.



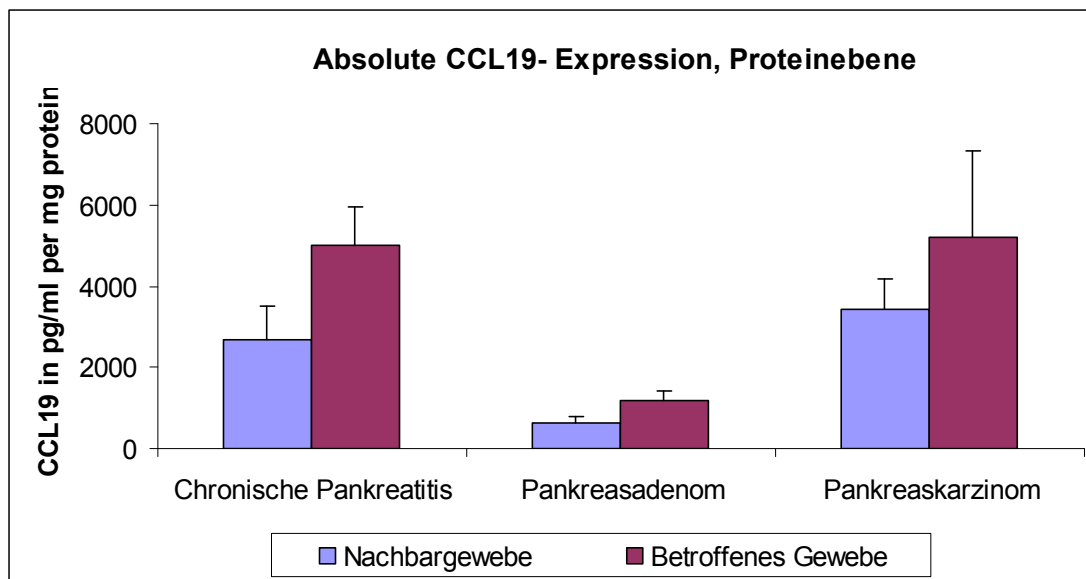
**Abb. 16: CCL19/CCR7 mRNA- Expression in Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP), Pankreasadenom (PA) und Pankreaskarzinom (PCA).** Q-RT-PCR Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben; n-facher Anstieg  $> 1$  zeigt CCL19/CCR7 Überregulation im Vgl. zum Normalgewebe an; \* $P < 0,05$ , n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.



**Abb. 17: CCL21/CCR7 mRNA- Expression in Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP), Pankreasadenom (PA) und Pankreaskarzinom (PCA).** Q-RT-PCR Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben; n-facher Anstieg  $> 1$  zeigt CCL21/CCR7 Überregulation im Vgl. zum Normalgewebe an; \* $P < 0,05$ , n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

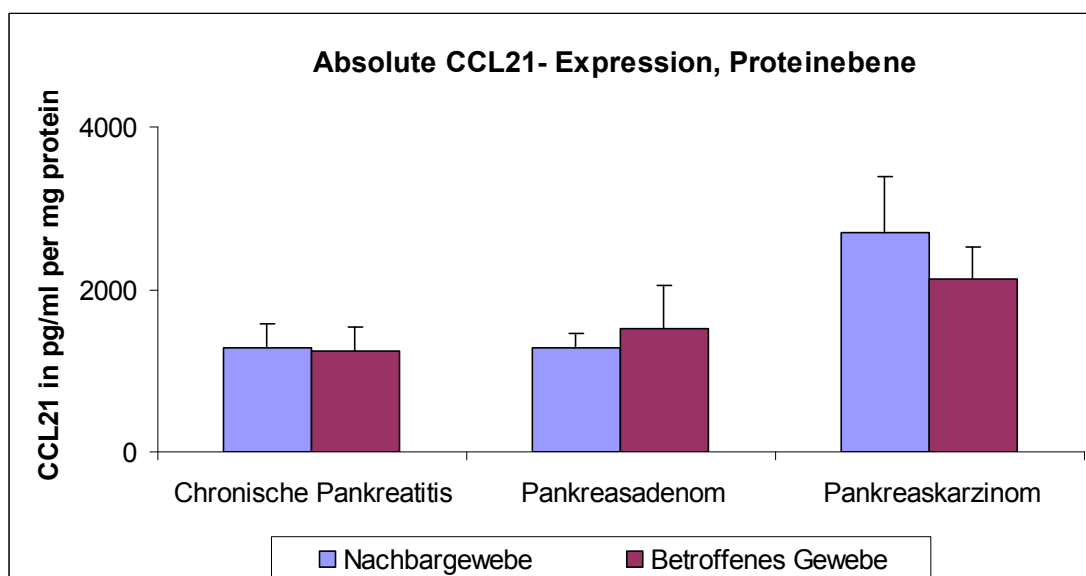
CCL19 ist im Tumorgewebe der Patienten mit Pankreaskarzinom nahezu 34-fach erhöht, CCL21 20-fach und CCR7 25-fach verglichen mit dem gesunden Nachbargewebe. Im erkrankten Gewebe der Patienten mit chronischer Pankreatitis zeigten die beiden Chemokine keine signifikante Überexpression im Vergleich zum gesunden Tumornachbargewebe. Die CCR7 Expression ist auch hier signifikant erhöht.

Auch bei den Patienten mit Pankreasadenom ergibt sich kein einheitliches Bild. Hier ist die Expression von CCL19 und CCL21 im kranken Gewebe im Vergleich zum gesunden Nachbargewebe nicht erhöht, während CCR7 eine signifikante Überexpression zeigt.



**Abb. 18: CCL19 Proteinexpression in Patienten mit chronischer Pankreatitis, Pankreasadenom und Pankreaskarzinom.** ELISA- Ergebnisse werden in pg/ml angegeben, \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

Auf der Proteinebene zeigte CCL19 keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen erkranktem und nicht betroffenem Gewebe, weder in den Geweben der chronischen Pankreatitis, noch im Pankreasadenom oder im Pankreaskarzinom.



**Abb. 19: CCL21 Proteinexpression in Patienten mit chronischer Pankreatitis, Pankreasadenom und Pankreaskarzinom.** ELISA- Ergebnisse werden in pg/ml angegeben, \*P < 0,05, n entspricht 7, 6 und 14 Patientenproben.

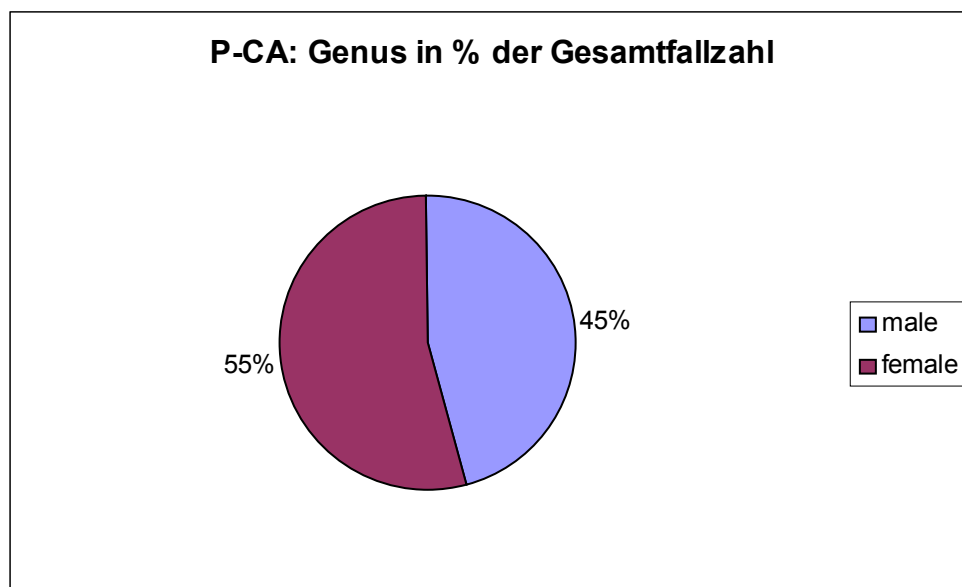
CCL21 zeigte auf der Proteinebene in den drei untersuchten Entitäten keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen erkranktem und nicht betroffenem Gewebe.



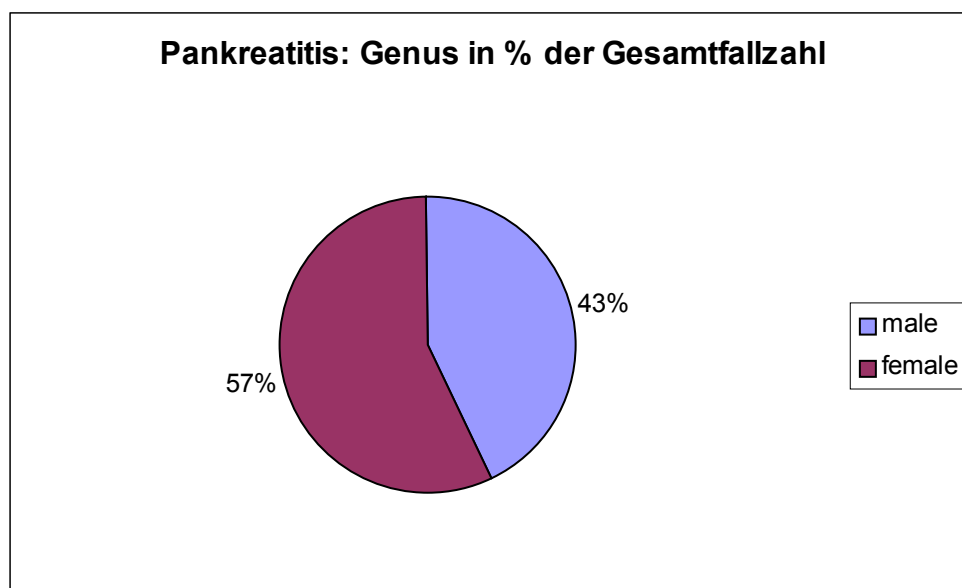
## Ergebnisse der Auswertung der Patientenakten

### 1. Geschlecht der Patienten:

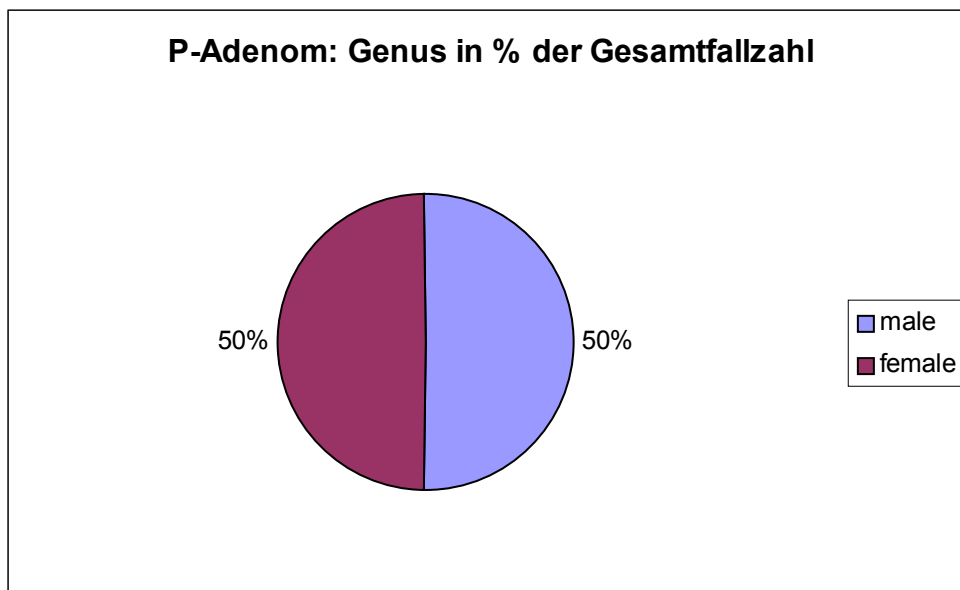
Betrachtet man das Geschlecht der Patienten der einzelnen Patientengruppen, so fällt auf, dass sowohl in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom, als auch in der Gruppe der Patienten mit Pankreatitis das weibliche Geschlecht in unserem Patientenkollektiv überwiegt (Pankreaskarzinom: 55% vs. 45%; Pankreatitis: 57% vs. 43%) während die Verteilung der Geschlechter in der Gruppe der Patienten mit Pankeasadenom gleichmäßig ist (50% vs. 50%).



**Abb. 20:** Pankreaskarzinom: Genus



**Abb. 21:** Pankreatitis: Genus

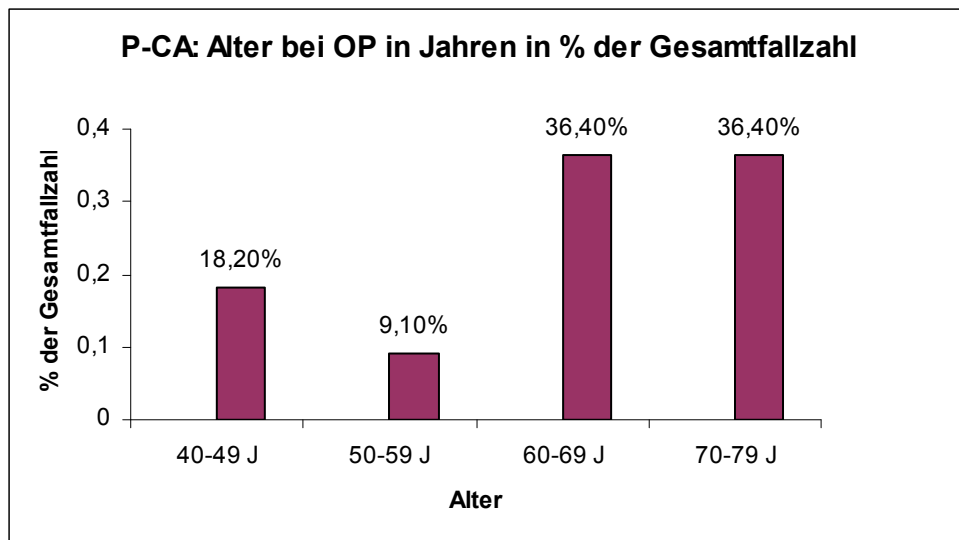


**Abb. 22:** Pankreasadenom: Genus

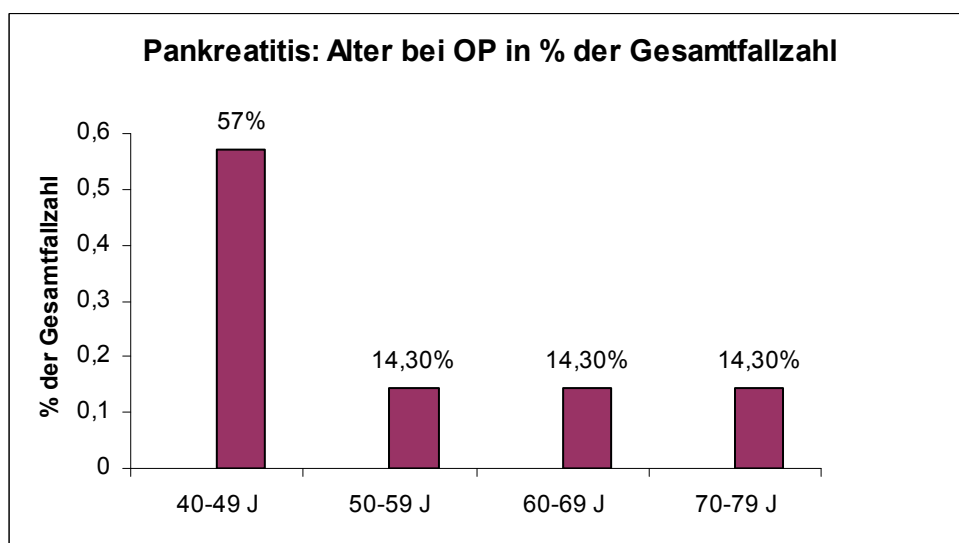
## 2. Alter der Patienten:

Bei der Betrachtung des Alters der Patienten bei OP unserer drei Patientengruppen fällt auf, dass die Patienten mit Pankreaskarzinom im durchschnitt deutlich älter waren als die Patienten mit Pankreasadenom bzw. chronischer Pankreatitis.

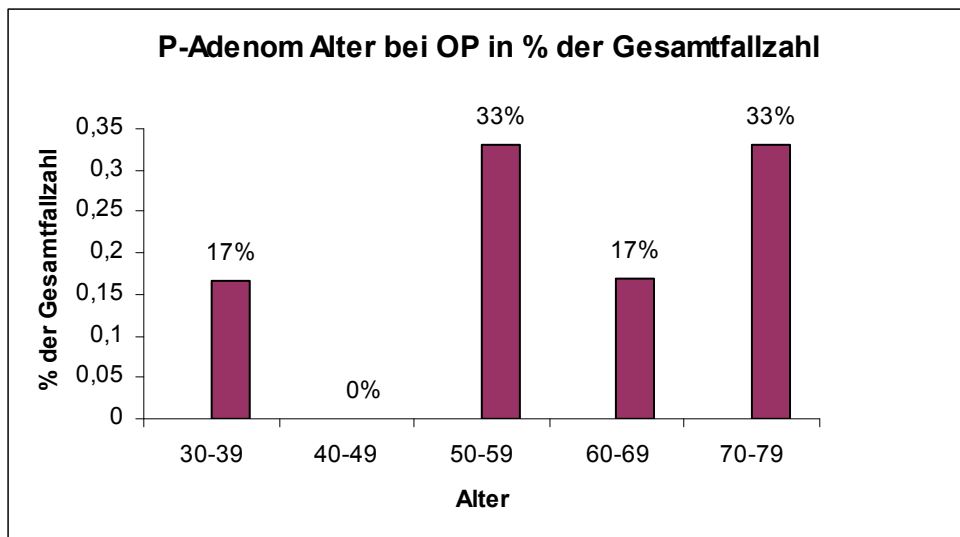
Liegt das durchschnittliche Alter der Patienten mit Pankreaskarzinom bei OP bei über 63 Jahren (Mittelwert: 63,25 Jahre), so liegt das der Patienten mit chronischer Pankreatitis bei 59 Jahren und das der Patienten mit Pankreasadenom bei 58 Jahren. Diese Altersverteilung legt die Vermutung nahe, dass Malignome eher eine Erkrankung des fortgeschritteneren Alters sind (Ausnahmen bestätigen die Regel: zwei Patienten der untersuchten Gruppe mit Pankreaskarzinom waren bei OP 41 respektive 49 Jahre alt) und dass Malignome womöglich die Folge nicht (-ausreichend) therapierter Adenome bzw. chronischer Pankreatitiden sind, gemäß der chronische Entzündung – Adenom – Karzinom – Sequenz, wie sie vom kolorektalen Karzinom bereits nachgewiesen und anerkannt ist.



**Abb. 23:** Pankreaskarzinom: Alter bei OP



**Abb. 24:** chronische Pankreatitis: Alter bei OP



**Abb. 25:** Pankreasadenom: Alter bei OP

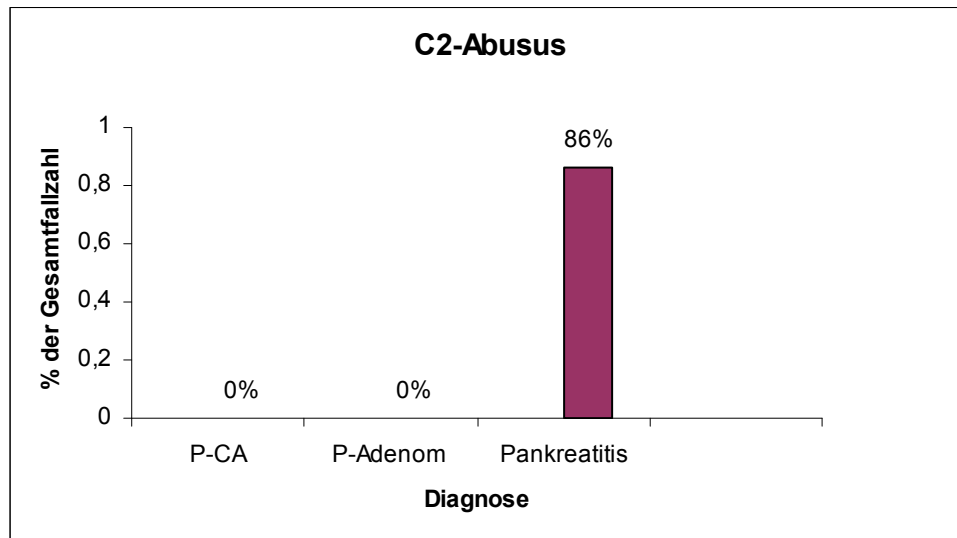
### 3. Pankreaskarzinom: Lage des Tumors



**Abb. 26:** Pankreaskarzinom: Lage

Die mit Abstand häufigste Lokalisation des Pankreaskarzinoms innerhalb unseres Patientenkollektivs war der Pankreaskopf mit 90%, gefolgt vom Corpuskarzinom. Ein Karzinom im Bereich des Pankreasschwanzes war in dem Kollektiv nicht enthalten. Gemäß der Verteilung der Lokalisation ergibt sich auch die entsprechende Verteilung der Operationsverfahren mit einem deutlich überwiegenden Anteil an sog. pyloruserhaltenden Whipple-Operationen (s.u.).

#### 4. C2-Abusus

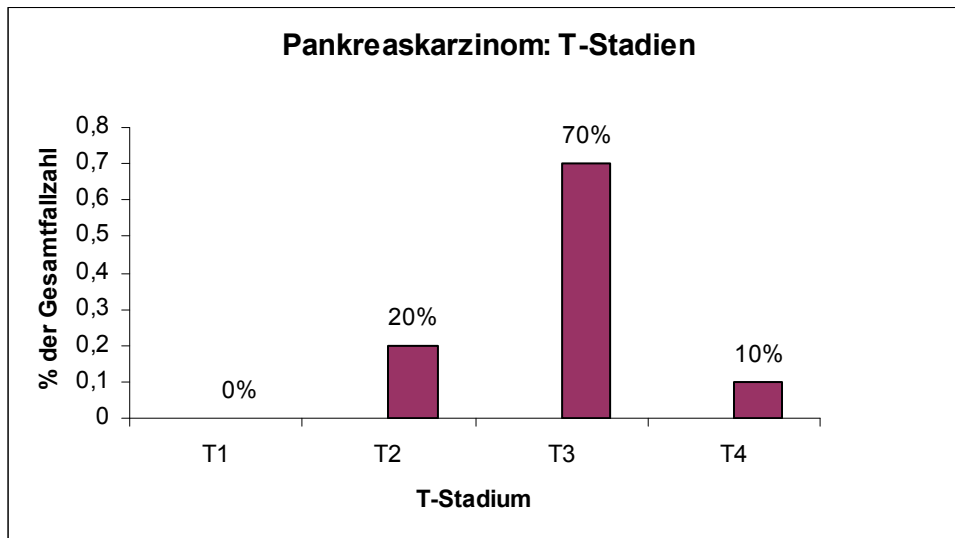


**Abb. 27:** C2-Abusus

Aus der Anamnese der Patienten ergibt sich, dass in unserem Patientenkollektiv ca. 86 % der chronischen Pankreatitiden direkte oder indirekte Folge eines chronischen Alkoholabusus waren. Diese Zahlen decken sich in etwa mit den Angaben der entsprechenden Fachliteratur zur Ätiologie der chronischen Pankreatitis (meist wird ein Wert um 90% angegeben).

Erstaunlich ist, dass bei keinem der Patienten aus den Gruppen der Pankreasadenome bzw. -Malignome eine entsprechende Vorerkrankung angegeben wurde, so daß bezüglich unseres Kollektivs weder ein Vermutung des Zusammenhangs zwischen dem Entstehen einer Pankreasneoplasie und Alkoholabusus, noch dem mit Nikotinabusus gemacht werden kann, der aber allgemein angenommen und in der Literatur auch entsprechend beschrieben wird.

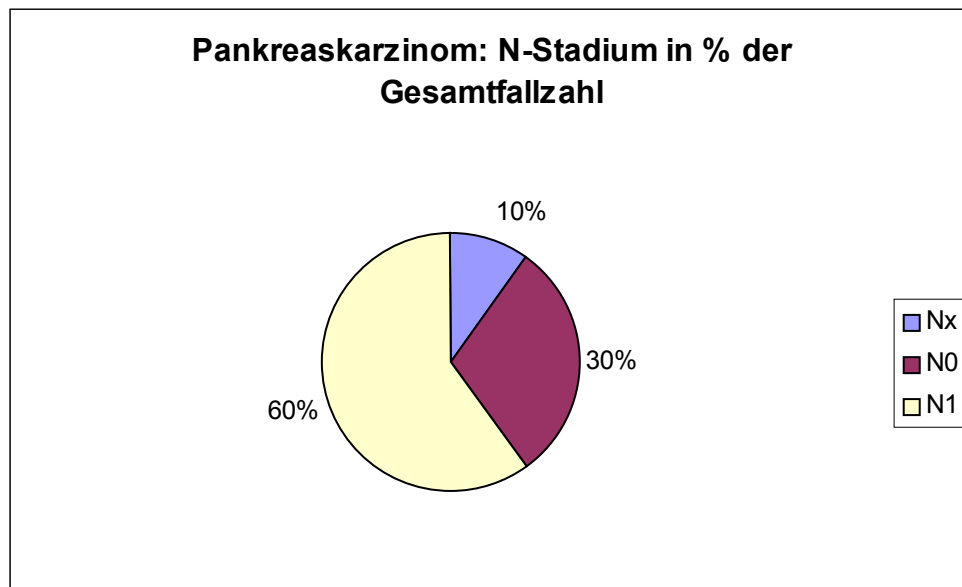
## 5. Pankreaskarzinom: T-Stadien



**Abb. 28:** Pankreaskarzinom: T-Stadien

Die Verteilung der Tumorstadien bei Erstdiagnose bzw. OP zeigt eine eindeutige Häufung im Bereich des T3-Stadiums (70 %), gefolgt vom T2-Stadium (20 %) und dem T4-Stadium (10 %). T1-Stadien sind überhaupt nicht enthalten. Dies entspricht auch den bisherigen Zahlen in der Literatur, nach denen das Pankreaskarzinom erst relativ spät diagnostiziert wird, da es auch erst in einem späten Stadium – wenn überhaupt – Beschwerden verursacht. Entsprechend negativ sind daher auch die Prognosen bei Diagnosestellung. Sensiblere diagnostische Parameter wären hier wünschens- bzw. erstrebenswert, um eine frühzeitigere Therapie einleiten und damit die Langzeitüberlebensaussichten der betroffenen Patienten verbessern zu können.

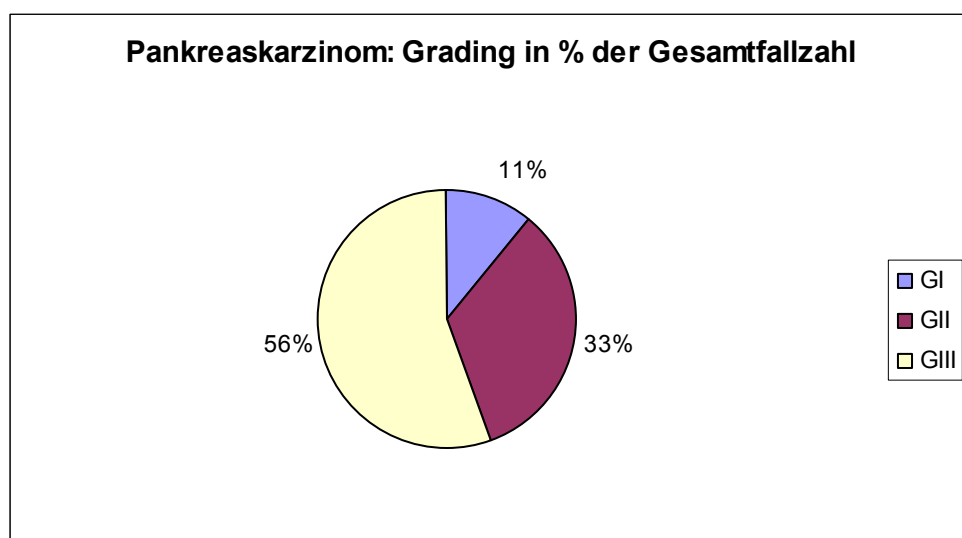
## 6. Pankreaskarzinom: N-Stadien



**Abb. 29:** Pankreaskarzinom: N-Stadien

In Anlehnung an die Zahlen zum Tumorstadium zeigt sich auch hier eine Häufung der Fälle mit N1-Stadium (60 %) gegenüber den Stadien N0 (30 %) bzw. Nx (10 %), also einer bei OP bereits erfolgten lymphatischen Ausbreitung des Tumors. Wäre es möglich den Tumor in einem früheren Stadium zu diagnostizieren, so würde die Häufigkeit der lymphatischen Streuung sicherlich auch abnehmen und damit die Prognose verbessern.

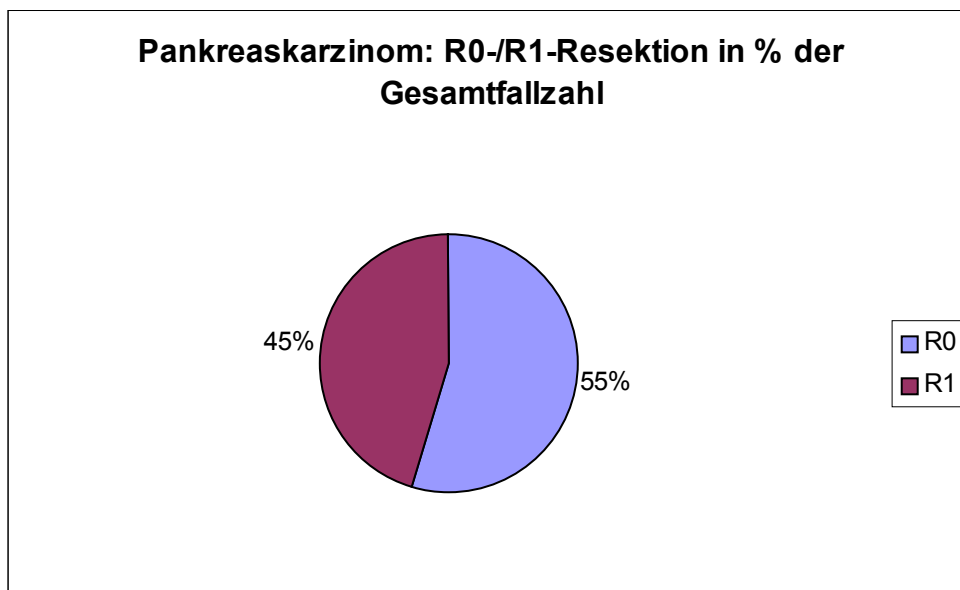
## 7. Pankreaskarzinom: Grading



**Abb. 30:** Pankreaskarzinom: Grading

Als dritter Parameter soll hier das Grading des Pankreaskarzinoms bei OP die These stützen, dass die Neoplasien bei Erstdiagnose bzw. OP bereits relativ weit fortgeschritten sind. So befinden sich weit über die Hälfte der Tumoren (56 %) bei OP bereits in einem GIII-Stadium im Vergleich zu 33 % im Stadium GII und nur 11 % im GI-Stadium.

#### 8. Pankreaskarzinom: R0-/R1-Resektion

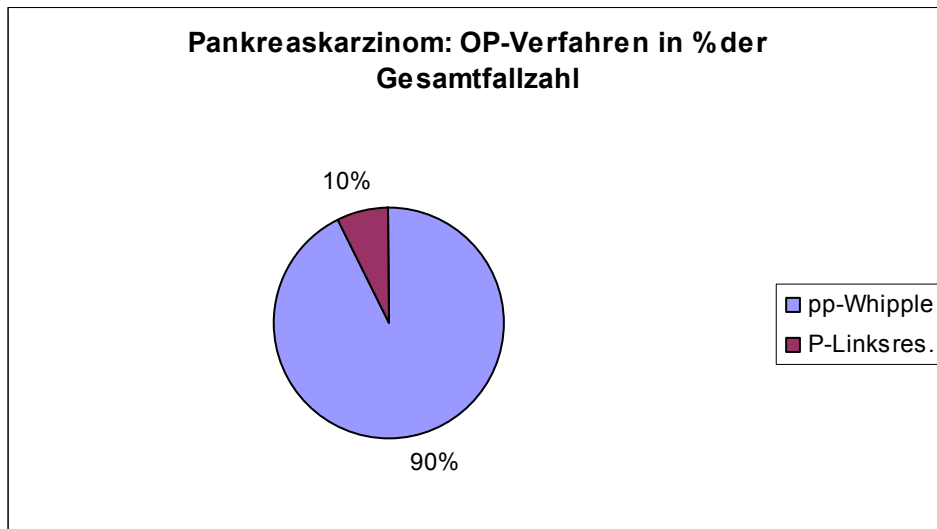


**Abb. 31:** Pankreaskarzinom: R0-/R1-Resektion

Als letzter Parameter soll der Vergleich zwischen der Anzahl der R0- bzw. R1-Resektionen des Pankreaskarzinoms innerhalb des untersuchten Kollektivs auf das bei Erstdiagnose bzw. OP bereits fortgeschrittene Krankheitsstadium hinweisen. So waren ganze 45 % - also fast die Hälfte der Karzinome - nicht mehr R0, also im Gesunden zu resezieren. Dem stehen nur 55 % R0-Resektionen gegenüber. Ein im Vergleich zu anderen Malignomen erstaunlich niedriger Wert.



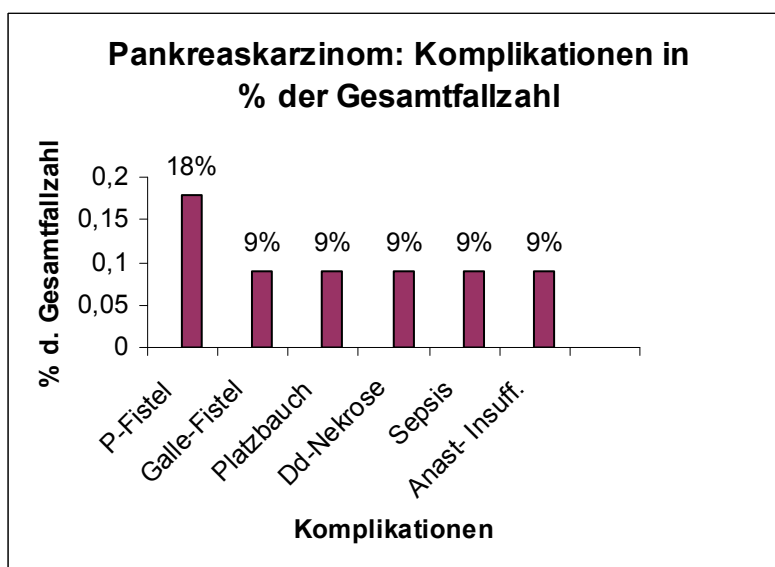
## 9. Pankreaskarzinom: OP-Verfahren



**Abb. 32:** Pankreaskarzinom: OP-Verfahren

Gemäß der Verteilung der Lokalisationen der Pankreaskarzinome in unserem Kollektiv ergibt sich auch o.g. Verteilung der OP-Verfahren mit einem Überwiegen der pyloruserhaltenden Whipple-OP (90 %), in der Regel angewandt bei Pankreaskopfkarzinom, im Vergleich zur Pankreaslinksresektion (10 %), angewandt bei Lokalisation des Tumors im Pankreaskorpus bzw. Schwanz.

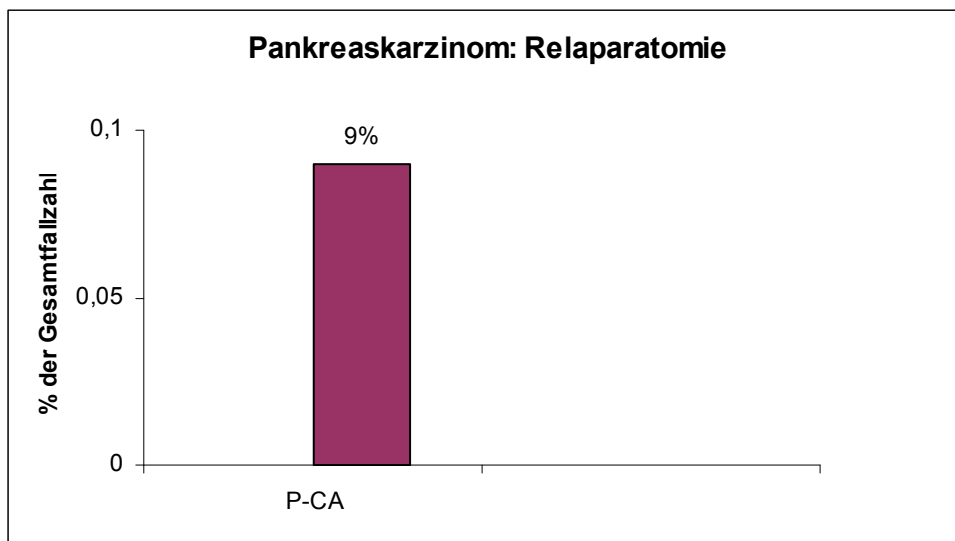
## 10. Pankreaskarzinom: Komplikationen



**Abb. 33:** Pankreaskarzinom: Komplikationen

Die mit Abstand häufigste Komplikation nach OP eines Pankreaskarzinoms mit 18 % in unserem Patientenkollektiv ist die Ausbildung einer sog. Pankreasfistel im Vergleich zu den nur etwa halb so oft auftretenden Komplikationen wie Ausbildung einer Gallefistel, postoperativer Platzbauch, Duodenalnektrose, Sepsis und Anastomoseninsuffizienz mit einer Häufigkeit von jeweils nur 9 %.

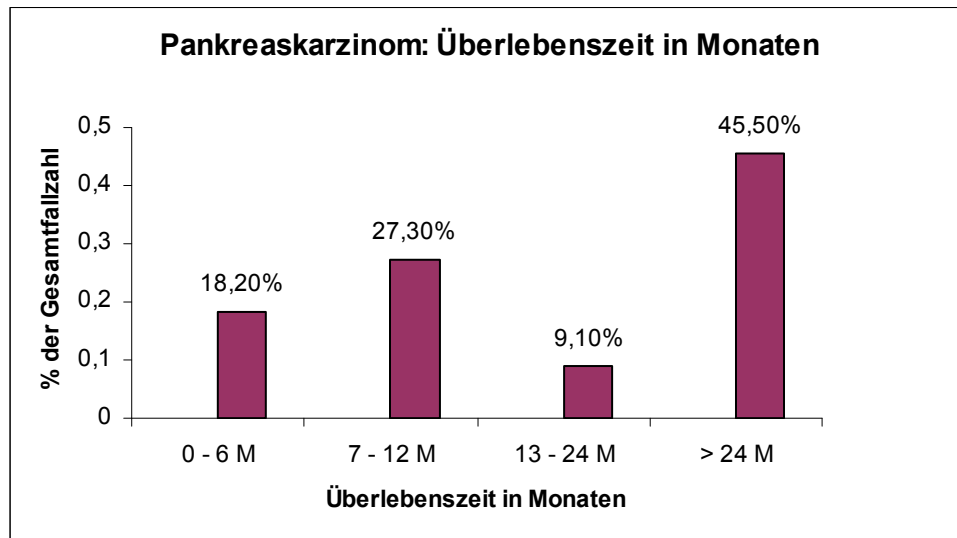
#### 11. Pankreaskarzinom: Relaparatomie



**Abb. 34:** Pankreaskarzinom: Relaparatomie

Eine erfreulich geringe Anzahl (9 %) der pankreatektomierten Patienten mit Pankreaskarzinom und postoperativen Komplikationen musste relaparatomiert werden. Die übrigen Komplikationen konnten somit konservativ behoben werden.

## 12. Pankreaskarzinom: Überlebenszeit in Monaten



**Abb. 35:** Pankreaskarzinom: Überlebenszeit in Monaten

Auch bei der Betrachtung der postoperativen Überlebenszeit zeigt sich eine erfreuliche Tendenz, so dass fast die Hälfte der Patienten mit Pankreaskarzinom (45,5 %) noch über zwei Jahre nach der Operation lebten. Die in der Literatur genannten Zahlen sind hier deutlich geringer. Eine 5-Jahres-Überlebenszeit war aufgrund der Datenlage und dem Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht zu erheben.

Nichtsdestotrotz zeigen die Zahlen - vor allem die Mortalität von über 18 % innerhalb des ersten halben Jahres nach OP - dass noch viel Raum zur Optimierung von möglichst frühzeitiger Diagnose und nachhaltiger Therapie bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms bleibt.

## 6. Diskussion

Im Hinblick auf die Wanderung von Leukozyten, insbesondere im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen, Zellschädigungen und der Entstehung und dem Wachstum maligner sowie nichtmaligner Tumoren spielen eine Anzahl von Chemokinliganden und ihre korrespondierenden Rezeptoren eine wichtige Rolle. Einige dieser Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren wurden von mir bezüglich der Entstehung maligner und nichtmaligner Pankreastumoren und der chronischen Pankreatitis näher untersucht.

Die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR6 und CCR7 sowie ihre zugehörigen Liganden CXCL12, CCL20 und CCL19/CCL21 wurden ausgewählt, da sie gemäß bereits vorliegender Studien (Rubie, *et al.*, 2006, 2008; Müller, *et al.*, 2001; Dellacasagrande, *et al.*, 2003; Takeushi, *et al.*, 2004) mit der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasierung verschiedener Tumoren (Ovarialkarzinom, kolorektales Karzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und hepatozelluläres Karzinom) in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Die Expression dieser Chemokinliganden und -rezeptoren wurde in Pankreaskarzinom-, Pankreasadenomgewebe und dem Gewebe chronischer Pankreatitiden im Vergleich mit dem benachbarten gesunden Gewebe sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gemessen. Dabei zeigten alle untersuchten Chemokinliganden und -rezeptoren ein spezifisches Expressionsmuster. Pankreasadenom und chronische Pankreatitis wurden als prä-maligne Erkrankungen ausgewählt, da sie häufig der Bildung von Pankreaskarzinomen vorausgehen.

Das duktales pankreatische Adenokarzinom stellt eine wichtige Ursache krebisbezogener Sterblichkeit in den westlichen Industrienationen dar. Es betrifft 9 von 10 Personen bezogen auf 100000 Menschen. Hierbei entspricht die Sterblichkeitsrate der Inzidenzrate. Sein aggressives Wachstumsverhalten ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Diagnosestellung in der Regel nicht vor der Entwicklung von Metastasen erfolgt und dieser Tumor nur sehr schlecht auf die verschiedenen Behandlungsoptionen anspricht. Histologisch sind diese Karzinome dadurch charakterisiert, dass die Krebszellen gangähnliche Strukturen bilden und eine deutliche fibrotische Reaktion häufig mit der Infiltration verschiedener Mengen von Entzündungszellen assoziiert ist. Die Mechanismen, durch die diese Zellen zum Pankreas rekrutiert werden, sind noch völlig unklar. Da CCL20 ein Chemokin ist, dass sehr stark zur selektiven Rekrutierung von Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten beiträgt (Baggiolini, *et al.*, 1997) und auch schon von einer Koexpression von CCL20/CCR6 in Pankreaskarzinomgewebe und in kultivierten humanen

Pankreaskarzinomzelllinien berichtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass CCL20 möglicherweise zu Entstehung und Entwicklung des Pankreaskarzinoms ursächlich beiträgt. Aus diesem Grund sollte zunächst die Expression dieses Chemokins und seines Rezeptors CCR6 in einer vergleichenden Untersuchung von Pankreatitisgewebe, Pankreasadenomgewebe und Pankreaskarzinomgewebe mittels Real-time PCR und ELISA untersucht werden. In meinen Untersuchungen konnte ich nachweisen, dass CCL20 im pankreatischen Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten normalen Gewebe signifikant überexprimiert wird. Dies zeigte sich sowohl auf der mRNA-Ebene wie auch auf der Proteinebene in den ELISA-Assays. Klinisch-pathologische Untersuchungen zeigten überdies, dass hierbei eine signifikante Korrelation zu fortgeschrittenen T-Stadien besteht, was zusätzlich auf eine Rolle des CCL20 für die Progression des Pankreaskarzinoms hinweist. Immunhistochemische Untersuchungen machten jedoch deutlich, dass die hohe Expression von CCL20 überwiegend auf eingewanderte Immunzellen und Inseln zurückzuführen ist, die die stärksten immunhistochemischen CCL20 Signale zeigten. Dies zeigt, dass infiltrierende Entzündungszellen innerhalb der Tumormasse hohe CCL20 Mengen exprimieren und diese Zellen deutlich zu der erhöhten CCL20 Expression in Pankreastumoren beitragen. Tumor-assoziierte Makrophagen könnten allerdings auch das Potential haben, das Tumorstadium und seine Progression zu fördern (Mantovani, *et al.*, 1994). So könnten Makrophagen, die das Tumornachbargewebe von Pankreastumoren umgeben, die Tumorentstehung dadurch fördern, dass sie wachstumsstimulierende Zytokine produzieren (Mantovani, *et al.*, 1994). Darüberhinaus könnten sie die Tumorerweiterung dadurch fördern, dass sie die Produktion von Matrix Metallproteinasen fördern und die Angiogenese anregen. Somit könnten Makrophagen indirekt das Tumorstadium fördern, indem sie verschiedene Funktionen wie Stroma- Auflösung und Neo-Vaskularisierung beeinflussen und auf diese Weise könnte die erhöhte CCL20 Expression in den Immunzellen zum Prozess der Pankreas- Tumorentstehung beitragen.

In den Geweben chronischer Pankreatitis hingegen wurde keine erhöhte Expression von CCL20 im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe gemessen. Chronische Pankreatitis wurde als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von Pankreaskarzinomen vorgeschlagen (Lowenfels, *et al.*, 1993; Ekbom, *et al.*, 1994). Allerdings ist das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms infolge einer chronischen Pankreatitis noch von verschiedenen anderen Faktoren abhängig wie Alter, Rauchen molekularen Mutationen, Fettleibigkeit oder Alkoholmissbrauch. Da das Expressionsprofil von CCL20 in den Patienten mit chronischer Pankreatitis völlig unauffällig war, kommt eine

mögliche Rolle von CCL20/CCR6 für den Prozeß der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms infolge einer chronischen Pankreatitis nicht in Betracht.

In den von mir untersuchten Pankreasadenomen, einer Erkrankung, die ebenfalls im Verdacht steht, der Entwicklung von Pankreaskarzinomen vorauszugehen, wurde ebenfalls keine erhöhte Expression von CCL20 im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe gemessen. Somit ist die Hochregulation von CCL20 mRNA und Protein in meinen Untersuchungen allein auf die Pankreaskarzinomgewebe beschränkt, wohingegen von mir keine Hochregulation in chronischer Pankreatitis und Pankreasadenomen gemessen wurde.

CCL20 entfacht seine Signalwirkung über den G-Protein gekoppelten Rezeptor CCR6. CCR6 wird im Gegensatz zu CCL20 auch in den von mir untersuchten Geweben chronischer Pankreatitiden und Pankreasadenomen sowie im Pankreaskarzinom im Vergleich zu dem jeweiligen Tumornachbargewebe signifikant hochexprimiert. Die immunhistochemische Untersuchung des Rezeptors zeigte allerdings, dass CCR6 Genprodukte in den von uns untersuchten Geweben nicht in Tumorzellen exprimiert werden. Andere Arbeitsgruppen konnten eine CCR6 Expression - allerdings durch in situ Hybridisierung und das heißt wiederum nur mRNA - auch in Tumorealen nachweisen (Kleef, *et al.*, 1999).

Während die mRNA Expression des Chemokinliganden CXCL12 in meinen Untersuchungen im Pankreaskarzinomgewebe unauffällig war, zeigte der zugehörige Rezeptor CXCR4 eine signifikante Überexpression im Pankreaskarzinomgewebe. CXCR4 ist der häufigste Rezeptor für CXCL12, allerdings kann CXCL12 noch einen anderen Rezeptor binden, den Chemokinrezeptor CXCR7, der auf der Oberfläche vieler verschiedener maligner Zelltypen gefunden wird. Die von mir gefundene signifikante Überexpression des Rezeptors CXCR4 im Pankreaskarzinomgewebe passt zu immunhistochemischen Befunden der neueren Literatur (Marechal, *et al.*, 2009), in denen CXCR4 Signale cytoplasmatisch verteilt in Tumorzellen von pankreatischen Adenokarzinomen gefunden wurden. Auch Daten von *in vitro* und murinen *in vivo* Modellen unterstreichen die kritische Rolle des CXCL12/CXCR4 Ligand/Rezeptorsystems für pankreatische Tumorzellen. Das CXCL12/CXCR4- System wirkt wahrscheinlich als parakriner Loop (Mori, *et al.*, 2004), um die Malignität pankreatischer Krebszellen zu erhöhen. Diese erhöhte Malignität wird einer Rolle von CXCR4 für die Zell Migration, die Matrix Degradierung und die Gewebeinvasion zugeschrieben, da der Ligand in vielen Geweben vorhanden ist und man annimmt, dass er die Migration in diese Gewebe fördert (Marchesi, *et al.*, 2004, Mori, *et al.*, 2004, Saur, *et al.*, 2005). In meinen Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Expressionserhöhung von CXCL12 im

Tumorgewebe gegenüber dem benachbarten Normalgewebeanteil. Aussagen im Hinblick auf eine mögliche Migrationsförderung CXCR4- tragender Pankreaskarzinomzellen, um die Malignität pankreatischer Krebszellen zu erhöhen, können somit durch meine Arbeiten nicht unterstützt werden.

Während meine Expressionsuntersuchungen auf der mRNA-Ebene eine signifikante Überexpression für die Chemokinliganden CCL19 und CCL21 zeigten, konnte dies auf der Proteinebene nur für CCL19 bestätigt werden. CCL19 und CCL21 sind die einzigen Liganden für den Chemokinrezeptor CCR7, der von verschiedenen Immunzelltypen exprimiert wird. Auch CCR7 wurde in meinen Expressionsuntersuchungen auf der mRNA-Ebene signifikant hochexprimiert. CCR7 und seine Liganden sind essentiell am Homing verschiedener Subpopulationen von T-Zellen und antigen-repräsentierenden dendritischen Zellen zu den Lymphknoten involviert. Erst kürzlich wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Rezeptors und der Metastasierung der Lymphknoten von Pankreaskrebspatienten gefunden (Nakata, *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte dieser Befund mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert werden. Daraus resultiert, dass CCR7 als prognostischer Faktor für Pankreaskrebs zunehmend an Bedeutung gewinnen könnte.

Während meine Untersuchungen der CXCL12/CXCR4 und CCL19/CCL21/CCR7 Ligand/Rezeptorsysteme keine eindeutigen Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung dieser Systeme an der Entstehung oder der Progression des Pankreaskarzinom zeigten, sah dies für das CCL20/CCR6 Ligand/Rezeptorsystem eindeutiger aus.

Meine Studien hierzu zeigten für den Chemokinliganden CCL20 und den korrespondierenden Rezeptor CCR6 eine signifikante Hochregulierung in Patienten mit Pankreaskarzinom. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass CCL20 hierbei mit fortgeschrittenen T-Stadien assoziiert ist. Daraus kann man schließen, dass CCL20 und CCR6 möglicherweise eine Rolle für die Entwicklung und die Progression des Pankreaskarzinoms spielen könnten. Eine Inhibierung des CCR6- Signalweges oder eine Neutralisierung von CCL20 Genprodukten, durch Inhibition der CCL20 Proteinproduktion oder der Proteinaktivität, könnten nützliche Wege darstellen, eine weitere Progression der Krankheit zu verhindern und eine zukünftige Behandlungsstrategie im Management des Pankreaskarzinoms darstellen.

Bisherige Ergebnisse zu den Chemokinliganden und –Rezeptoren bzw. anderen Tumorentitäten deuten darauf hin, dass diese nicht nur in der lokalen Entstehung und Progression des malignen Primärtumors eine entscheidende Rolle spielen, sondern auch bei der Absiedlung in andere Organe und Lymphknoten, da sie in direkten Zusammenhang mit der Gefäßneubildung, Zellwanderung und damit Metastasierung stehen (Kollmar *et al.*, 2007, Shi *et.al.*, 1999).

So konnte ein Einfluß der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR6 auf die Entstehung von Lebermetastasen in kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen bereits nachgewiesen werden (Kollmar *et al.*, 2007, Rubie *et al.*, 2006 und Müller *et al.*, 2001). Die Ergebnisse meiner Untersuchungen decken sich hinsichtlich der Überexpression der Chemokinrezeptoren im Gewebe maligner Tumoren mit den Ergebnissen früherer Studien. Es handelt sich hier zwar um rein deskriptive Untersuchungen, dennoch kann man aus den vorliegenden Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen zur Expression der Chemokinliganden und ihren korrespondierenden –Rezeptoren im Gewebe von malignen Pankreastumoren schließen, dass diese ein durchaus vielversprechendes therapeutisches Angriffsziel bei der Bekämpfung des Wachstums und der Metastasierung maligner Pankreastumoren sein könnten. Damit könnten die bisherigen Therapieoptionen deutlich erweitert und die Langzeitprognose betroffener Patienten womöglich erheblich verbessert werden.

Hinsichtlich der Auswertung der Patientendaten der von mir untersuchten Gewebeproben lassen sich ebenfalls interessante Rückschlüsse auf die drei verschiedenen Pankreaserkrankungen ziehen.

Dass eine langjährige chronische Pankreasentzündung die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Pankreasmalignoms deutlich erhöht, ist bereits des Öfteren in der Literatur beschrieben bzw. in Studien untersucht worden. Ein Zusammenhang zwischen der zeitlichen Sequenz Adenom -> Karzinom - wie beim kolorektalen Karzinom bereits nachgewiesen - ist ebenfalls anzunehmen. Entsprechend weisen auch die Altersangaben der Patienten bei OP in meinem Kollektiv bei den (noch-) nicht malignen Pankreaserkrankungen ein niedrigeres Alter auf, als die der Patienten mit Pankreaskarzinom. Im Vergleich zum durchschnittlichen Alter der Patienten bei OP mit kolorektalen Karzinom erscheinen die Patienten mit Pankreaskarzinom jedoch jünger zu sein, was auf ein schnelleres Wachstum und damit größeres aggressives Potential dieser Tumorerkrankung schließen ließe.



Der Unterschied in der Geschlechterverteilung der einzelnen Erkrankungen, in dem von mir untersuchten Patientenkollektiv scheint mir dagegen eher zufällig zu sein.

Ein Zusammenhang zwischen der Lebensweise und der Entstehung der einzelnen Pankreaserkrankungen ist bis auf die gehäufte Entstehung einer chronischen Pankreatitis bei Alkoholabusus bislang noch nicht nachgewiesen. Allerdings sind – wie auch bei anderen malignen Tumoren – Zusammenhänge z.B. mit der Gewohnheit zu Rauchen, Fehlernährung sowie Umwelteinflüssen anzunehmen.

Bei den von mir untersuchten Patienten zeigte sich ebenfalls bei einer deutlich erhöhten Zahl von Patienten mit chronischer Pankreatitis ein zuvor bestehender Alkoholabusus. Obwohl die chronische Pankreatitis langfristig die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms erhöht, konnte bei Patienten aus diesem Kollektiv keine erhöhte Anzahl von Alkoholabusus in der Vorgeschichte nachgewiesen werden. Ein Grund für diese scheinbare Diskrepanz könnte jedoch in der gesellschaftlichen Stigmatisierung der Suchterkrankungen und einer damit schambesetzten Verleugnung durch den Patienten im Anamnesegespräch liegen.

Angesichts der Verteilung der Tumorstadien der Patienten meiner Untersuchungsgruppe spiegelt sich die Tatsache wieder, dass das Pankreaskarzinom häufig lange Zeit nahezu völlig symptomlos wächst und damit erst im fortgeschrittenen Stadium bei entsprechender Symptomatik (z.B. schmerzloser Ikterus, Gewichtsabnahme, Pankreasinsuffizienz, neu aufgetretener Diabetes mellitus, ausgeprägte B-Symptomatik) diagnostiziert wird. 70% der Patienten wiesen bei OP bereits ein T3-Stadium auf. Entsprechendes trifft auch auf den Befall benachbarter Lymphknoten und das Grading zu. Bei ca. 60% der Patienten waren bei der OP bereits Lymphknoten befallen. 56% der Patienten hatten einen GIII-Tumor. Diagnose und OP bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium wirken sich natürlich deutlich negativ auf die Prognose aus.

Verbesserung der Diagnostik (z.B. jährliches Check-up mit Ultraschalluntersuchung des Abdomens sowie einem umfangreichen Labor mit Leber- und Pankreaswerten eventuell erweitert um die Tumormarker CA19-9 und CEA ab einem gewissen Alter bzw. einer bestimmten Vorerkrankung) könnten bei entsprechend frühzeitig eingeleiteter Therapie die Prognose dieser Erkrankung möglicherweise verbessern.

Trotz der o.g. relativ späten Diagnose der malignen Pankreastumoren und damit fortgeschrittenen Tumorstadien bei OP ist es dennoch erstaunlich, dass noch bei über der

Hälfte der operierten Patienten (55%) eine R0-Resektion möglich war. Im Vergleich zu anderen Malignomen (z.B. colorektales Karzinom) allerdings eine eher niedrige Anzahl.

Aufgrund der häufigeren Lokalisation der Pankreaskarzinome im Pankreaskopfbereich (s. Pankreaskarzinom: Lage) ergibt sich konsequenterweise auch eine höheren Anzahl an entsprechenden OP-Verfahren mit pyloruserhaltender Whipple-OP im Vergleich zur Pankreaslinksresektion mit Splenektomie. Bei 90% der Patienten lag das Karzinom im Pankreaskopfbereich, bei 10% im Bereich des Corpus und bei keinem der operierten Patienten des von mir untersuchten Kollektivs lag das Karzinom im Pankreasschwanzbereich. Daraus ergibt sich die entsprechende Verteilung der OP-Verfahren mit 90% pp-Whipple Operationen und nur 10% Pankreaslinksresektionen mit Splenektomie.

In Folge der Pankreasresektion kam es am häufigsten zu der Komplikation der Ausbildung einer Pankreasfistel. Bei fast einem Fünftel (18%) aller operierten Patienten meines Kollektivs etablierte sich postoperativ eine Pankreasfistel. Die übrigen Komplikationen wie Gallefistel, postoperativer Platzbauch, Duodenalneekrose, Sepsis oder Anastomoseninsuffizienz traten nur halb so häufig auf (jeweils 9%).

Ebenfalls nur 9% der zuvor pankreatektomierten Patienten mussten sich aufgrund von postoperativen Komplikationen bzw. Rezidiven einer Relaparatomie unterziehen. D.h. bei der überwiegenden Mehrheit (81%) kam es entweder zu keinerlei postoperativen Komplikationen oder diese konnten konservativ beherrscht werden.

Im Vergleich zur anderen Studien (z.B. Bokemeyer, Heidemann *et al.*, 1998), nach denen die mediane Überlebenszeit nach R0-Resektion eines Pankreaskarzinoms nur zwischen 12 und 18 Monaten betrug, zeigte sich bei den von mir untersuchten Patienten eine deutlich längere postoperative Überlebenszeit von über 24 Monaten bei 45,5% - also fast der Hälfte – der pankreatektomierten Patienten. Die von Brand und Tempere ermittelte 5-Jahres-Überlebensrate von unter 1% aller Patienten mit Pankreaskarzinom konnte von mir aufgrund der fehlenden Langzeitdaten weder bestätigt noch widerlegt werden.

Dennoch weisen die bislang erhobenen Daten darauf hin, dass sowohl die Diagnoseverfahren als auch die prä- bzw. postoperativen Therapieverfahren des Pankreaskarzinoms noch viel Raum für Verbesserungen lassen. Nach wie vor überleben nur etwa 15 – 20% aller Patienten mit Pankreaskarzinom das erste Jahr nach Diagnosestellung. Nach kolorektalem Karzinom und Magenkarzinom ist das Pankreaskarzinom das dritthäufigste gastrointestinale Karzinom und mit einer Mortalität von 10/100.000 Einwohnern ist das Pankreaskarzinom die fünfhäufigste Todesursache infolge einer Krebserkrankung in der westlichen Welt.

## **7. Anhang**

### **7.1. Verzeichnis der Tabellen:**

Tab. 1: Patienten mit Pankreaskarzinom

Tab. 2: Patienten mit Pankreasadenom

Tab. 3: Patienten mit chronischer Pankreatitis

Tab. 4: Assays on demand

Tab. 5: Primärantikörper ELISA

Tab. 6: Sekundärantikörper ELISA

Tab. 7: Standard ELISA

Tab. 8: Pipettierschema „relative Quantifizierung“

Tab. 9: Pipettierschema „absolute Quantifizierung“

### **7.2. Verzeichnis der Abbildungen:**

Abb. 1: Prozess der Invasion und Metastasierung (Schneider, 2005)

Abb. 2: Cytokine: Einteilung und Funktion

Abb. 3: Struktur des Chemokins CCL5

Abb. 4: Signalkaskade des Chemokins CXCL12

Abb. 5: schematische Darstellung der Struktur von CCR7 und eine potentielle Signalkaskade

Abb. 6: markierte Hybridisierungssonde

Abb. 7: Reporterfarbstoff emittiert Fluoreszenzfarbstoff

Abb. 8: Ermittlung des CT-Wertes

Abb. 9: Erstellen einer Standardkurve

Abb. 10: CCL20/CCR6 : m-RNA-Expression

Abb. 11: CCL20 : Proteinexpression

Abb. 12: IHC: Ductales Adenokarzinom

Abb. 13: IHC: Anteil einer Perineuralscheideninfiltration

Abb. 14: CXCL12/CXCR4: m-RNA-Expression

Abb. 15: CXCL12: Proteinexpression

Abb. 16: CCL19/CCR7 : mRNA-Expression

Abb. 17: CCL21/CCR7: m-RNA-Expression

Abb. 18: CCL19 : Proteinexpression

Abb. 19: CCL21 : Proteinexpression  
Abb. 20: Pankreaskarzinom : Geschlecht der Patienten  
Abb. 21: chronische Pankreatitis: Geschlecht der Patienten  
Abb. 22: Pankreasadenom: Geschlecht der Patienten  
Abb. 23: Pankreaskarzinom: Alter bei OP  
Abb. 24: chronische Pankreatitis: Alter bei OP  
Abb. 25: Pankreasadenom: Alter bei OP  
Abb. 26: Pankreaskarzinom: Lage  
Abb. 27: Pankreaskarzinom, chron. Pankreatitis, Pankreasadenom: C2-Abusus  
Abb. 28: Pankreaskarzinom: T-Stadien  
Abb. 29: Pankreaskarzinom: N-Stadien  
Abb. 30: Pankreaskarzinom: Grading  
Abb. 31: Pankreaskarzinom: R0/R1-Resektionen  
Abb. 32: Pankreaskarzinom: OP-Verfahren  
Abb. 33: Pankreaskarzinom: postoperative Komplikationen  
Abb. 34: Pankreaskarzinom: Relaparatomien  
Abb. 35: Pankreaskarzinom: Überlebenszeit in Monaten

### 7.3. Literaturverzeichnis:

1. Adachi S, Kuwata T, Miyaike M, Iwata M, Induction of CCR7 expression in thymocytes requires both ERK signal and Ca(2+) signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001: 288: 1188 - 1193
2. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM (2000). "The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenetic activity" *J. Immunol.* 2000: 165: 5269 – 5277
3. Adsay NV, El-Rayes BF, Philip PA (2001). "Pankreatic cancer: The evolving role of systemic therapy" *Expert Opin Pharmacother* 2001: 2: 1939-1947
4. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JT, Mori T, Wilttrout RH, Ymaguchi K (2002). "Antitumor effects induced by dendric cell-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters" *Cancer Letters* 2002: 184: 37 – 47
5. Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR, Schäfer H (2003). „role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine induced cell death" *Oncogene* 2003: 22: 3243 – 3251
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 1997: 15: 675-705
7. Banas B, Wornle M, Merkle M, Gonzalez-Rubio M, Schmid H, Kretzler M, Pietrzyk MC, Fink M, Perez de Lema G, Schlondorff D. Binding of the chemokine SLC/CCL21 to its receptor CCR7 increases adhesive properties of human mesangial cells. *Kidney Int.* 2004: 66: 2256 - 2263
8. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM (2000). „CXC chemokines in angiogenesis" *J. Leukoc. Biol.* 2000: 68: 1 – 8
9. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson RB (2002) "Phase III study of gemcitabine in combination with fluoruracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297" *J. Clin. Oncol.* 2002: 20: 3270 – 3275
10. Boyle P, Ferlay J (2004). "Cancer incidence and mortality in Europe" *Ann. Oncol.* 2005: 16: 481 – 488

11. Brand RE, Tempero MA (1998). "Pancreatic cancer" Curr. Opin. Oncol. 1998: 10: 362 – 366
12. Breitfeld D, Ohl H, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R, Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production, j. Exp. Med., 2000: 192: 1545 – 1552
13. Brokemeyer C, Heidemann E; Bauchspeicheldrüse, Erkrankungen der Verdauungsorgane, in: rationelle Diagnostik und Therapie in der Inneren Medizin, Leipzig, 1999
14. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Crippes MC, Parteno RK (1997). "Improvements in survival and clinic benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial" J. Clin. Oncol. 1997: 15: 2403 – 2413
15. Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF (1996). "Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma: clinicopathologic analysis of 5-year survivors" Ann. Surg. 1996: 223: 273 – 279
16. Dellcasagrande J, Schreurs OJ, Hofgaard PO, Omholt H, Steinsvoll S, Schenck K, Bogen B, Dembic Z, Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6. Scand. J. Immunol. 2003: 57: 534 - 544
17. Ding XZ, Tong WG, Adrian TE (2000). "Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells" Anticancer Res. 2000: 20: 2625 – 2631
18. Duschl *et al.*; Cytokine und Chemokine, Salzburg 2006
19. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R (2004). "Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis" Cancer 2004: 101: 2727 – 2736
20. Ekbohm A, McLaughlin JK, Karlsson BM, Nyrén O, Gridley G, Adami HO, Fraumeni JF Jr. Pancreatitis and pancreatic cancer: a population-based study. J Natl Cancer Inst 1994, 86:625-627.
21. Eckel F. *et al.*; "Pankreaskarzinom – von der Molekularbiologie zu innovativen Therapien?", München 2006
22. Eibl G, Reber HA, Wente MN, Hines OJ (2003). „The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulfide induces apoptosis in pancreatic cancer cells independent of COX-2" Pancreas 2003: 26: 33 – 41

23. Fires H, Kleeff J, Klockow N, Ebert M, Malfertheiner P, Büchler MW (1999). „Molekulare Veränderungen bei Pankreas- und periampullären Karzinomen“ Chir. Gastroenterol. 1999: 15: 150 – 157
24. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell 1999: 99: 23 - 33
25. Folkman J (2001). „A new family of mediators of tumor angiogenesis” Cancer Invest. 2001: 19: 754 – 755
26. Friess *et al.*; „Molekulare Veränderungen beim Pankreaskarzinom”, Wien 1997
27. Garcea G, Nael CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP (2005). „Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review” Eur. J. Cancer 2005: 41: 2213 – 2236
28. Gijssbers K, Gouwy M, Struyf S, Wuyts A, Proost P, Opdenakker G, Penninckx F, Ectors N, Geboes K, Van Dame J (2005). “GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors” Exp. Cell Res. 2005: 303: 331 – 342
29. Glazyrin AL, Adsay VN, Vaitkevicius VK, Sarkar FH (2001). “CD-95-related apoptotic machinery is functional in pancreatic cancer cells” Pancreas 2001: 22(4): 357 – 365
30. Glen P, Jamieson NB, McMillan DC, Carter R, Imrie CW, McKay CJ (2006). “Evaluation of an inflammation-based prognostic score in patients with inoperable pancreatic cancer” Pancreatology 2006: 6: 450 – 453
31. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. J. Immunol. 2000: 165: 499 – 508
32. Herzog H, Hort YJ, Shine J, Selbie LA, Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation. DNA Cell. Biol. 1993: 12: 465 - 471
33. Howes N, Neoptolemos JP (2002). “Risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in chronic pancreatitis” Gut 2002: 51: 765 – 766
34. Ivarsson K, Runesson E, Sundfeldt K, Haeger M, Hedin L, Janson PO, Branstroem M (1998). “The chemotactic cytokine interleukin-8: a cyst fluid marker for malignant epithelial ovarian cancer?” Gynecol. Oncol. 1998: 71: 420 – 423

35. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). „Cancer statistics, 2007“ CA Cancer J. Clin. 2007: 57: 43 – 66
36. Jüngling B.; „Klinisch prospektive Studie über die Wertigkeit von Androgenen, Östrogenen und ihren Metaboliten als Tumormarker bei Pankreaskarzinomen im Vergleich zu CEA und CA 19-9“; Heidelberg 1997
37. Keim *et al.*; „Ist die chronische Pankreatitis eine Präkanzerose?“; Leipzig 1997
38. Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Buchler MW, Zlotnik A, Korc M. Detection and localization of MIP3alpha /LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. Int. J. Cancer 1999: 81: 650-65
39. Kleeff *et al.*; „Molekulare Aspekte des Pankreaskarzinoms – Ein Update“; Berlin 2008
40. Klosterhalfen *et al.*; „Epidemiologie und Pathogenese des Pankreaskarzinoms“, Aachen 1992
41. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Menger MD, Schilling MK (2007). „Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis“ Eur. J. Surg. Oncol. 2007: 33: 803 – 811
42. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2006). „Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration and tumor growth in hepatic metastasis“ Ann. Surg. Oncol. 2006: 13: 263 – 275
43. Korc M (1998). „Role of growth factors in pancreatic cancer“ Surg. Oncol. Clin. N. Am. 1998: 7: 25 – 41
44. Lee HJ, Choi SC, Lee MH, Oh H, *et al.* Increased expression of MIP-3alpha/CCL20 in peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and its down-regulation by sulfasalazine and glucocorticoid treatment. Inflamm. Bowel Dis. 2005: 11: 1070 - 1079
45. Li Y, Singh B, Ali N, Sarhar FH (1999). “Induction of growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells by auristatin-PE and gemcitabine” Int. J. Mol. Med. 1999: 3: 647 – 653
46. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL (2000). “Pancreatic cancer: state-of-the-art care” CA Cancer J. Clin. 2000: 50: 241 – 268
47. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. Pancreatitis and the risk for pancreatic cancer. N Engl J Med 1993, 328:1433-1437.



48. Luan J, Sahttuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burcick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A (1997). "Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression" *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62: 588 – 597
49. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest.* 1994 71:5-16.
50. Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. *Cancer Res.* 2004 64:8420-7.
51. Maréchal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, Closset J, Devière J, Salmon I, Van Laethem JL. *Br. J. Cancer.* 2009 100:1444-51
52. Mori T, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Ito D, Kami K, Masui T, Fujimoto K, Tamamura H, Hiramatsu K, Fujii N, Imamura M., 2004
53. Müller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001; 410: 50 – 56
54. Nagira M, Imai T, Hieshima K *et al.* Molecular cloning of novel human CC chemokine secondary lymphoid - tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J. Biol. Chem.* 1997/98: 272: 19518 - 19524
55. Nakata B, Shinya Fukunaga S, Noda E, Amano R, Nobuya Yamada N, Hirakawa K. Chemokine Receptor CCR7 Expression Correlates with Lymph Node Metastasis in Pancreatic Cancer. *Oncology* 2008: 74:69-75
56. Oliveira Frick V, Rubie C, Wagner M, Graeber S, Grimm H, Kopp B, Rau B, Schilling MK. Enhanced ENA-78 and IL-8 expression in patients with malignant pancreatic diseases. *Pancreatology* 2008; 8: 488-497
57. Pachynski RK, Wu SW, Gunn MD, Erle DJ, Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7 – mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressing cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J. Immunol.* 1998: 161: 952 – 956
58. Patel D, Koopman W, Imai T, *et al.* Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin. Immunol.* 1999: 99: 43 - 52
59. Rosenkilde MM; Schwartz TW (2004). „The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease” *APMIS* 2004: 112: 481 – 495
60. Rosewicz S, Wiedenmann B (1997). „Pancreatic carcinoma“ *Lancet* 1997: 349: 485 – 489

61. Rubie C, Frick VO, Wagner M, Rau B, Weber, C, Kruse B, Kempf K, Tilton J, König J, Schilling M. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma. *Scan J Immunol* 2006; 63: 468-477.
62. Rubie C, Oliveira V, Kempf K, Wagner M, Tilton B, Rau B, Kruse B, König J, Schilling M. Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis. *Tumor Biol* 2006; 27: 166-174
63. Rubie C, Oliveira Frick V, Ghadjar P, Wagner M, Grimm H, Vicinus B, Justinger C, Graber S, Schilling M. CCL20/CCR6 expression profile in pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2010;8:45.
64. Rubie C, Kollmar O, Oliveira Frick V, Wagner M, Brittner B, Graeber S, Schilling MK. Differential CXC receptor expression in colorectal malignancies. *Scan J Immunol* 2008; 68:635-644.
65. Rubie C, Oliveira Frick V, Wagner M, Schuld J, Graeber S, Bohle RM, Schilling MK. ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions. *BMC Cancer* 2008; 8:178-189.
66. Rubie C, Oliveira Frick V, Pfeil S, Wagner M, Kollmar, Kopp B, Gräber S, Rau B, Schilling MK. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 37: 4996-5002.
67. Rubie C, Oliveira Frick V, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, König J, Rau B, Schilling MK. Chemokine Expression in Hepatocellular Carcinoma versus Colorectal Liver Metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 41: 6627-6633.
68. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probe* 2005; 19: 101-109.
69. Saur D, Seidler B, Schneider G, Algül H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Schmid RM. *Gastroenterology*. 2005 Oct;129(4):1237-50
70. Schneider *et al.*; "Pathogenese des Pankreaskarzinoms", *Der Internist*, Berlin 01/2005
71. Schutyser E, Struyf S, Damme J, The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003; 14: 409 - 426
72. Shi Q, Abbuzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K (1999). "Constitutive and inducible interleukin-8 expression by hypoxia and acidosis renders human

- pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic” Clin. Cancer Res. 1999: 5: 3711 – 3721
73. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, *et al.* The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature 1998: 393: 591 - 594
  74. Takamori H, Oades ZG, Hoch RC, Burger M, Schraufstatter IU (2000). „Autocrine growth effect of IL-8 and GRO-alpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1” Pankreas 2000: 21: 52 – 66
  75. Takatomo Koshiba<sup>1</sup>, Ryo Hosotani, Yoshiharu Miyamoto, Jun Ida, Shoichiro Tsuji, Sanae Nakajima, Michiya Kawaguchi, Hiroyuki Kobayashi, Ryuichiro Doi, Toshiyuki Hori, Nobutaka Fujii and Masayuki Imamura. Expression of Stromal Cell-derived Factor 1 and CXCR4 Ligand Receptor System in Pancreatic Cancer: A Possible Role for Tumor Progression. Clinical Cancer Research 2000: 6: 3530-3535
  76. Takeushi H, Fujimoto A, Tanaka M, *et al.* CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. Clin. Cancer Res. 2004: 10: 2351 - 2358
  77. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprassert Y, *et al.* Chemokines in tumor progression and metastasis. Cancer Science 2005 : 96 : 317 - 322
  78. Trevino JG, Summy JM, Gray MJ, Nilsson MB, Lesslie DP, Baker CH, Gallick GE (2005). „Expression and activity of Src regulate interleukin-8 expression in pancreatic adenocarcinoma cells: implication for angiogenesis” Cancer Res. 2005: 65: 7214 – 7222
  79. Tumorzentrum München (2001). “Manual gastrointestinale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge gastrointestinaler Tumoren“ 2001: 6: 181 – 196
  80. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI (2006). „A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer” Cancer Res. 2006: 66: 3071 – 3077

